



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**Facultad de Ciencias**



Departamento de Química Inorgánica

# **SÍNTESIS DE MATERIALES DE FOSFATO TRICÁLCICO PARA REGENERACIÓN O SUSTITUCIÓN ÓSEA.**

**SISTEMA  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  -  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ .**

**Memoria presentada por:**

**Ismael Humberto García Páez**

Para optar al grado de:  
**Doctor en Ciencias Químicas**

**Bajo la dirección de:**

**Dra. M<sup>a</sup> Pilar Pena Castro    Dr. Antonio H. De Aza Moya**

Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV-CSIC)  
Madrid, Septiembre de 2011



*A mi esposa e hijos*

**Este trabajo se ha llevado a cabo en el departamento de Cerámica del Instituto de Cerámica y Vidrio-ICV (CSIC) en el marco de los proyectos:**

- CICYT MAT-2006-12749-C02-01 “Síntesis y obtención de nuevos biomateriales de fosfato tricálcico en los sistemas  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaSiO}_3$  y  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Mg}_3(\text{PO}_4)_3\text{-CaSiO}_3$ . Estudios in vitro”.
- CICYT MAT2010-17753 “Nuevos materiales ceramicos bioactivos en sistemas en equilibrio y en no equilibrio”.



El autor rinde homenaje a la memoria del Prof. Salvador De Aza (Madrid, 1933-2011) quien dedicó su vida científica a los estudios teóricos y experimentales de los diagramas de equilibrio de fases y su aplicación al diseño de los materiales cerámicos.



## **AGRADECIMIENTOS**

En el marco institucional agradezco a la Universidad Francisco de Paula Santander de San José de Cúcuta, Colombia, por la concesión de la comisión de estudios y al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias por la financiación de mis estudios doctorales.

Quiero agradecer a la Dra. Prof. María del Pilar Pena y al Dr. Antonio H. De Aza por su respaldo, dedicación, confianza, consejos, y por la excelente asistencia profesional con la que han dirigido esta tesis.

Agradezco a la Dra. Carmen María Casado Santana, del departamento de química inorgánica de la Universidad Autónoma de Madrid, por haber aceptado la tutela de la presente tesis.

El carácter multidisciplinar de esta investigación ha requerido la participación de diferentes personas e instituciones, por lo tanto agradezco a:

- Dr. Antonio López Bravo y Dr. Juan Parra Cáceres y al grupo de colaboradores del Hospital Provincial de Ávila por el esmerado esfuerzo y dedicación durante la realización de los estudios de cultivos celulares.

- Dr. Jesús Sanz y Dra. Isabel Sobrados del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, por la ayuda ofrecida en el uso de la técnica de resonancia magnética nuclear.

Agradezco al Instituto de Cerámica y Vidrio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y a su personal, en especial a:

- El personal científico, en especial a los investigadores: Dra. Carmen Baudín, Dr. Miguel Angel Rodríguez y Dr. Raúl García por su desinteresada colaboración en la discusión de los resultados.

- Dra. Marlin Magallanes, Elena Palacios, Leticia Carvajal y Alberto Pérez del grupo de diagrama de equilibrio de fases, por el apoyo recibido durante estos cuatro años.

- A los compañeros de servicios generales por la oportuna y eficiente ayuda ofrecida en cada una de las técnicas de caracterización.

- A todo el personal de administración por la oportuna colaboración en la realización de la gran cantidad de trámites durante estos cuatro años.
- A todos y cada uno de los compañeros y amigos investigadores pre y postdoctorales por la ayuda, los buenos momentos y la agradable compañía.

Gracias a todos.

## Glosario de Abreviaturas

### ***Técnicas de análisis***

Análisis térmico diferencial	ATD
Análisis termo gravimétrico	TG
Análisis por Fluorescencia de rayos X	FRX
Análisis por espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo	ICP-OES
Difracción de rayos X	DRX
Microscopia electrónica de barrido con emisión de campo	MEB-EC
Espectroscopía de dispersión de energías de Rayos X	EDE
Resonancia magnética nuclear de rotación en ángulo mágico	RMN-RAM
Resonancia magnética nuclear	RMN
Espectroscopía Raman	ER
Transformada de Fourier de Infrarojo	FTIR
Microscopía de Calefacción	MC

### ***Característica/Propiedad***

Coefficiente de dilatación	$\alpha$
Módulo de rotura	MOR
Módulo de elasticidad / Young	E
Resistencia a la compresión diametral	RCD
Temperatura de fusión	T <sub>f</sub>

### ***Compuestos***

Fosfatos de calcio	CaP
Fosfato de calcio amorfo, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	ACP
Fosfato dicálcico anhidro, $\text{CaHPO}_4$	DCP – DCPA
Fosfato dicálcico dihidratado, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	DCPD
Pirofosfato cálcico, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	CPP – $\text{C}_2\text{P}$
Fosfato tetracálcico, $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2^\circ$	TTCP – $\text{C}_4\text{P}$
Fosfato octacálcico, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	OCP
$\beta$ -Fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )	$\beta\text{-C}_3\text{P}$
$\alpha$ -Fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )	$\alpha\text{-C}_3\text{P}$
Hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )	Hap
Fosfato tricálcico apatítico	ap- $\text{C}_3\text{P}$
Apatita deficiente en calcio	ap dCa
Fosfato tricálcico amorfo, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	am- $\text{C}_3\text{P}$
Diópsido ( $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ )	CMS <sub>2</sub>
Circona tetragonal estabilizada con ytria- $\text{Y}_2\text{O}_3$	Y-TZP
Mezcla Hidroxiapatita - $\beta\text{-C}^3\text{P}$	BCP
Tetrametilsilano	TMS

### ***Ensayos de bioactividad***

Suero fisiológico artificial	SFA
Tris (hidroximetil) aminometano, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$	Tris



## RESUMEN

En la presente tesis doctoral se han desarrollado materiales monofásicos y bifásicos dentro del sistema fosfato tricálcico  $[(Ca_3(PO_4)_2]$  - diópsido  $[CaMg(SiO_3)_2]$ . En el estudio se ha contemplado la síntesis y caracterización de polvos de  $Ca_3(PO_4)_2$  y  $CaMg(SiO_3)_2$  y las etapas de diseño de las composiciones, síntesis, sinterización y caracterización microestructural y mecánica, así como estudios de bioactividad *in vitro* de los compactos obtenidos.

Para diseñar correctamente los materiales a estudiar, se ha determinado experimentalmente el sistema fosfato tricálcico  $[(Ca_3(PO_4)_2]$  - diópsido  $[CaMg(SiO_3)_2]$ . Consecuencia de este estudio ha sido la confirmación de la composición y temperatura del punto eutéctico binario  $Ca_3(PO_4)_2$ - $CaMg(SiO_3)_2$ . Así mismo, se ha determinado la composición y la temperatura de un nuevo punto peritético:  $\beta$ -  $Ca_3(PO_4)_2 \rightarrow \alpha$ - $Ca_3(PO_4)_2$  + Líquido.

Más concretamente, el procesamiento de los distintos materiales estudiados incluyó la síntesis de  $Ca_3(PO_4)_2$  puro, estequiométrico y dopado con Si y Mg y de  $CaMg(SiO_3)_2$  puro y estequiométrico. Así como, la obtención de compactos de  $Ca_3(PO_4)_2$  y de  $Ca_3(PO_4)_2$ - $CaMg(SiO_3)_2$  y el estudio del proceso de sinterización y la caracterización de los materiales finales y de los obtenidos en todas las etapas intermedias.

La síntesis de polvos de  $Ca_3(PO_4)_2$  se ha abordado por dos métodos: a) solución-precipitación y b) molienda de atrición de alta energía. Los polvos obtenidos han sido caracterizados mediante Fluorescencia de Rayos X (FRX), Difracción de Rayos X (DRX) y Espectroscopias Raman (ER) y de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^{31}P$  y  $^{29}Si$ . Mediante FRX, RMN y DRX se ha podido confirmar que el Mg y el Si entran en la red cristalina del  $Ca_3(PO_4)_2$  formando soluciones sólidas estables hasta 1440° C con la estructura del  $\beta$ -  $Ca_3(PO_4)_2$ .

Durante la etapa de procesamiento y caracterización de los compactos, se han estudiado los parámetros más significativos de los procesos de sinterización de los polvos de  $Ca_3(PO_4)_2$  obtenidos y de mezclas seleccionadas de  $Ca_3(PO_4)_2$ - $CaMg(SiO_3)_2$ , así como de sinterización reactiva de mezclas de  $Ca_3(PO_4)_2$ - $CaCO_3$ - $MgO$ - $SiO_2$ . Se ha estudiado el efecto de distintas variables como la composición de las materias primas, la temperatura y el tiempo para optimizar el proceso.

Para lograr los objetivos de esta etapa se usaron técnicas de caracterización desde el punto de vista *Térmico*: Análisis Térmico Diferencial (ATD) y dilatometría. *Estructural*: DRX, *Microestructural*: Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (MEB-EC), *Analítico*: Análisis por Dispersión de Energías (MEB-EC-EDS) y *Mecánico*: se determinó el esfuerzo de rotura mediante experimentos de compresión diametral y flexión en tres puntos. Estableciendo el módulo de Young (E) utilizando la técnica de resonancia.

Todo lo anteriormente descrito, ha permitido establecer el procesamiento necesario para obtener materiales de  $\beta$ -,  $\alpha+\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss dopado con Mg y Si y  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss- $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  con densidades y propiedades mecánicas óptimas (composición, temperatura de sinterización y velocidades de calentamiento y enfriamiento). Se ha comprobado que la presencia de pequeñas cantidades de MgO y  $\text{SiO}_2$  da lugar a la formación de líquidos a  $\approx 1277^\circ \text{C}$ , que generan procesos de sinterización en presencia de líquidos transitorios, lo que mejora la densificación de los materiales. Las diferencias entre las propiedades mecánicas obtenidas para los materiales sinterizados monofásicos y bifásicos se atribuyen a diferencias microestructurales (tamaño de grano y de poro, porosidad, microgrietas y composición mineralógica).

Finalmente, se han realizado los estudios *in vitro* de los compactos obtenidos:

El estudio de la solubilidad en Tris-HCl ha mostrado que los materiales desarrollados reaccionan con esta solución mediante un proceso de disolución-precipitación dando lugar a la formación de apatita. Los materiales basados en  $\beta$ - $\text{C}_3\text{P}$  presentan una reactividad muy inferior a la de los materiales basados en  $\alpha$ - $\text{C}_3\text{P}$ . En los materiales con silicio se detecta la liberación de iones Si al medio así como un aumento significativo de la concentración de iones Ca y P en el SFA.

En los experimentos de solubilidad *in vitro* en Suero Fisiológico Artificial (SFA) los materiales con presencia de  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  han liberado una mayor cantidad de iones Ca, P y Si al medio de SFA. Esta característica es de gran importancia si se tiene en cuenta que la concentración de los iones (Si, Mg), tras la disolución, está dentro del rango que genera una mayor proliferación de osteoblastos (osteoestimulación). Sin embargo, no se ha observado la formación sobre su superficie de capas de un grosor detectable de apatita. Si se tiene presente que varias investigaciones han demostrado que el  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  es de los pocos materiales que aunque no forme esta capa puede



generar una unión buena con el hueso, se puede concluir que este experimento no es concluyente con respecto a la capacidad de los materiales desarrollados de unirse al hueso.

Los osteoblastos fetales humanos sembrados sobre la superficie de los distintos materiales desarrollados presentan una alta adhesión y proliferación celular. Los resultados obtenidos indican que los materiales desarrollados no son citotóxicos por lo que todos ellos pueden ser considerados biocompatibles.

Los materiales de fosfatos desarrollados ( $\beta$ -  $\alpha$ + $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ ) tienen propiedades mecánicas ( $\text{MOR} \approx 40 \text{ MPa}$  y  $E \approx 60 \text{ GPa}$ ) y comportamiento *in vitro* próximo o mejor, según el caso, a los fosfatos comerciales que se utilizan actualmente en aplicaciones biomédicas. El proceso de obtención usado en la presente tesis: molienda de atrición de alta energía de las materias primas seguido de sinterización reactiva en el rango de temperaturas  $1200\text{-}1400^\circ \text{C}$  produce materiales con porosidades variables de  $\beta$ -,  $\alpha$ + $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  o  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ . Este método es económicamente viable, fácilmente trasladable a una planta de fabricación en serie de cerámica técnica y susceptible de producir implantes con composiciones químicas, mineralógicas y porosidades reproducibles.

Las relativamente bajas propiedades mecánicas de los materiales desarrollados limitan su aplicación a zonas sometidas a cargas medias o bajas tales como: otorrinolaringología, cirugía maxilofacial, dental e implantes periodontales. También pueden ser utilizados en la fabricación de andamiajes porosos para el crecimiento de células o en el relleno de defectos óseos.



## INDICE

	Pág
<b>Capítulo 1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Biocerámicas en la sociedad	3
1.2 Biocerámicas y sus aplicaciones clínicas	3
1.3 Biocerámicas basadas en fosfato tricálcico	6
1.3.1 El am-C <sub>3</sub> P	7
1.3.2 El ap-C <sub>3</sub> P	8
1.3.3 El β-C <sub>3</sub> P	9
1.3.4 El α-C <sub>3</sub> P	11
1.3.5 Algunas consideraciones sobre los fosfatos tricálcicos	12
1.4 Soluciones solidas en los fosfatos cálcicos	13
1.4.1 ¿Por qué adicionar silicio y magnesio a los fosfatos tricálcicos?	14
1.5 Aplicaciones y usos de las biocerámicas basadas en C <sub>3</sub> P	15
Referencias	18
 <b>Capítulo 2. HIPOTESIS Y PROPÓSITO DE LA TESIS</b>	 25
 <b>Capítulo 3. MATERIAS PRIMAS, METODOS Y TECNICAS EXPERIMENTALES</b>	 29
3.1 Métodos y técnicas experimentales	31
3.1.1. Análisis químico por Fluorescencia de Rayos X (FRX) y espectrometría de plasma (ICP-EOS)	31
3.1.2 Caracterización física del material particulado	32
3.1.3. Difracción de Rayos X (DRX)	32
3.1.4. Microscopía óptica y electrónica (MOLR-MEB-EC-EDE)	33
3.1.5. Análisis Térmico Diferencial y termogravimétrico (ATD-TG)	34
3.1.6. Microscopía de alta temperatura o de calefacción (MC)	34
3.1.7 Dilatometría	35
3.1.8 Espectroscopía Raman	35
3.1.9 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. RMN	35
3.1.10 Estudios de propiedades mecánicas	36
3.1.10.1 Resistencia a la compresión diametral	36
3.1.10.2 Módulo de elasticidad	37

	Pág
3.1.10.3 Resistencia a la fractura. Método de flexión en tres puntos	38
3.1.11 Experimentos de bioactividad	39
3.1.11.1 Estudio de solubilidad en Tris-HCl	39
3.1.11.2 Estudio <i>in vitro</i> en SFA	39
3.1.12 Ensayos de biocompatibilidad <i>in vitro</i> en cultivos celulares	40
3.1.12.1 Protocolo del ensayo MTT	41
3.1.12.2 Protocolo del ensayo Alamar blue™.	42
3.1.12.3 Protocolo del ensayo de morfología y proliferación celular bajo microscopía electrónica de barrido (MEB)	43
3.2 Materias primas utilizadas en el desarrollo del proyecto	44
3.2.1 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	44
3.2.2 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	46
3.2.3 $\text{CaHPO}_4$ .	47
3.2.7 $\text{MgO}$	48
3.2.9 $\text{CaCO}_3$	48
3.2.10 $\text{SiO}_2$	48
Referencias	52
<b>Capítulo 4. DIAGRAMA DE FASES FOSFATO TRICALCICO <math>[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]</math></b>	<b>53</b>
<b>– DIOPSIDO <math>[\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2]</math></b>	
4.1 Revisión Bibliográfica.	55
4.2 Procedimiento Experimental	55
4.2.1 Síntesis de $\text{C}_3\text{P}$	55
4.2.2 Síntesis de $\text{CMS}_2$	56
4.2.3 Estudios de las fases en equilibrio.	57
4.2.4 Caracterización de los productos	59
4.3 Resultados experimentales	59
4.3.1. Análisis mineralógico	59
4.3.2. Transformación polimórfica del $\text{C}_3\text{P}$	59
4.3.3. Estudio Microestructural	62
4.3.4. Formación de soluciones sólidas	65
4.4 Discusión de los resultados.	65
4.5 Conclusiones	70
Referencias Bibliográficas	71

	Pág.
<b><u>Capítulo 5. SINTESIS Y CARACTERIZACION QUIMICA Y MINERALÓGICA DE FOSFATO TRICALCICO.</u></b>	73
5.1 Revisión Bibliográfica	76
5.1.1 Fundamentos físico-químicos de los procesos de obtención de polvos de fosfato tricálcico por solución-precipitación	76
5.1.2 Síntesis de las fases de fosfato tricálcico por solución-precipitación	81
5.1.3 Fundamentos físico-químicos de los procesos de obtención de polvos de fosfato tricálcico por reacción en estado sólido	82
5.1.4 Síntesis de las fases polimórficas de fosfato tricálcico mediante reacción en estado solido	83
5.2 Síntesis de $\beta$ -C <sub>3</sub> P previa síntesis de ap-C <sub>3</sub> P por solución-precipitación	85
5.2.1 Procedimiento Experimental	85
5.2.2 Resultados Experimentales	87
5.2.2.1 Caracterización de los ap-CaP's obtenidos por vía húmeda	87
5.2.2.2 Comportamiento térmico de los productos obtenidos	91
5.2.2.3 Caracterización estructural	94
5.2.3 Consideraciones finales a la síntesis por solución-precipitación	109
5.3 Síntesis de $\beta$ -C <sub>3</sub> P por reacción en estado sólido de polvos activados mecánicamente. (C <sub>3</sub> P puro y con adiciones de Mg- y Si)	112
5.3.1 Procedimiento experimental	112
5.3.2 Resultados	113
5.3.3. Consideraciones finales a la síntesis en estado sólido.	124
5.4 Conclusiones	124
Referencias	126
<b><u>Capítulo 6. OBTENCION DE COMPACTOS EN EL SISTEMA FOSFATO TRICALCICO-DIOPSIDO. CARACTERIZACION MICROESTRUCTURAL, MINERALOGICA Y MECANICA.</u></b>	129
6.1 Revisión Bibliográfica.	131
6.1.1 El procesamiento cerámico	131
6.1.2 Sinterización, procesamiento y propiedades mecánicas de cerámicos de C <sub>3</sub> P	135
6.2. Procedimiento Experimental	136
6.3 Resultados	138
6.3.1 Estudio de la sinterización	138

	Pág.
6.3.2 Características microestructurales	148
6.3.2.1 Microestructura de las muestras C90 y C95	148
6.3.2.2 Microestructura de la muestras de composición C40	155
6.3.3 Caracterización mecánica	157
6.3.3.1 Prueba de compresión diametral	157
6.3.3.2 Resistencia a la flexión en tres puntos:	164
6.4 Discusión	169
6.5 Conclusiones	171
Referencias	173
 <b>Capítulo 7. ESTUDIOS IN VITRO EN SOLUCIONES ACELULARES: ENSAYOS DE BIODEGRADABILIDAD EN TRIS-HCl ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD EN SUERO FISIOLOGICO ARTIFICIAL</b>	 175
7.1 Revisión Bibliográfica	178
7.1.1 Estudio de los procesos de disolución de los materiales bioactivos	178
7.1.2 Mecanismo de formación de apatita en los materiales bioactivos	181
7.1.3 Propiedades Biológicas del C <sub>3</sub> P	182
7.2 Materiales Estudiados	183
7.3 Estudio de solubilidad en Tris-HCl	186
7.3.1 Propiedades físico-químicas de los polvos	186
7.3.2 Perfiles de liberación de iones	187
7.3.3 Caracterización mineralógica	187
7.3.4 Estudios microestructurales	190
7.3.5 Simulación termodinámica de la disolución enTris-HCl	191
7.4 Estudios <i>in vitro</i> en SFA	193
7.4.1 Perfiles de liberación de iones	193
7.4.2 Caracterización microestructural	195
7.4.3 Análisis de Espectroscopía Raman	199
7.4.4 Discusión de los resultados experimentales del estudio de la bioactividad	200
7.5 Simulación termodinámica del proceso de disolución en Tris-HCl y SFA	201
7.5.1 Mecanismos de disolución de C3P-precipitación de Hap	205
7.5.2 Comparación de los resultados experimentales con los de la simulación termodinámica.	209
7.6 Discusión final	211

	Pág.
7.7 Conclusiones	213
Referencias	216
<b><u>Capítulo 8. ESTUDIOS IN VITRO. EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD UTILIZANDO UN CULTIVO PRIMARIO DE OSTEOLASTOS HUMANOS</u></b>	219
8.1 Revisión Bibliográfica	222
8.1.1 Estudio de adhesión y migración celular	223
8.1.2 Estudio de viabilidad y proliferación celular	224
8.1.3 Cultivos celulares en C <sub>3</sub> Ps	225
8.2 Desarrollo Experimental	226
8.3 RESULTADOS	229
8.3.1 Ensayo MTT. Cuantificación de la Citotoxicidad In Vitro.	231
8.3.2 Ensayo Alamar blue™. Análisis de la adhesión y proliferación celular sobre la superficie de los materiales utilizando cultivos de osteoblastos humanos.	232
8.3.3 Morfología y proliferación celular bajo microscopía electrónica de barrido (MEB)	236
8.4 Discusión	240
8.5 Conclusiones	242
Referencias	243
<b><u>Capítulo 9. CONCLUSIONES GENERALES</u></b>	245
<b><u>APENDICES</u></b>	250





**Capítulo 1**  
**INTRODUCCIÓN**



Como parte introductoria a la tesis se presenta una revisión bibliográfica general sobre las biocerámicas y sus aplicaciones clínicas, con énfasis en los fosfatos tricálcicos y en el interés de las soluciones solidas de Si y Mg en estas biocerámicas. Al inicio de cada uno de los capítulos experimentales se presenta una revisión bibliográfica específica sobre: estabilidad térmica, síntesis, solubilidad y comportamiento celular de las biocerámicas de fosfato tricálcico.

## **1.1 Biocerámicas en la sociedad**

La continua mejora de la calidad de vida en los países desarrollados está conduciendo a un progresivo aumento de la esperanza de vida de la población. Según datos de la OMS, en el año 2020 más de 1.000 millones de personas en el mundo superarán los 60 años y, de ellos, 710 millones vivirán en países desarrollados. Europa continuará siendo la región más “vieja” del mundo con aproximadamente 500 millones de ellos. Problemas como la osteoporosis, artritis, pérdida de densidad ósea o la obesidad, supondrán que una de cada dos mujeres y uno de cada cinco hombres mayores de 65 años sufrirá algún tipo de fractura, con lo que el mercado de productos para sustitución de articulaciones podrá crecer entre un 5 y un 10 % anual en las próximas décadas. Éste es sólo un ejemplo del mercado potencial de la industria de los biomateriales en un futuro próximo. Actualmente entre EEUU y UE generan un mercado de más de 300 millones de €; y La Comisión Europea estima que el sector de los biomateriales tendrá un crecimiento a nivel mundial en torno al 12% en los próximos años, lo que indica una oportunidad de expansión de este sector en el desarrollo científico, industrial y tecnológico.

En los últimos años, el campo de los biomateriales ha experimentado un gran avance gracias a una importante promoción de la investigación, desarrollo e innovación (I+D+i), así, los ministerios de Ciencia, Sanidad y Consumo han establecido desde 2001, líneas de investigación orientadas en el sector de los Biomateriales para la mejora de la salud y el bienestar social.

## **1.2 Biocerámicas y sus aplicaciones clínicas**

Los materiales diseñados para cumplir una función biológica específica cuando se implantan en un organismo vivo se denominan biomateriales<sup>(1)</sup>. En la actualidad

abarcen un gran número de materiales con innumerables usos, con gran interés económico y, lo más importante, una gran incidencia social.

En los últimos años, la idea de contar con materiales capaces de sustituir o regenerar el hueso se ha desarrollado progresivamente. El hueso<sup>(2)</sup> es una estructura compleja, compuesta principalmente por sales inorgánicas, una matriz orgánica y agua. El principal componente inorgánico del hueso es la hidroxiapatita<sup>(3)</sup>, un fosfato de calcio nanocrystalino, que representa, aproximadamente, más del 70% de su peso seco. La fracción orgánica está constituida por el colágeno de tipo I. Como fase minoritaria se encuentra el carbonato de calcio junto con muy pequeñas cantidades de magnesio, silicio, sodio, y cinc.

Actualmente se utilizan en sustitución o regeneración ósea biomateriales metálicos, poliméricos, cerámicos y materiales compuestos.

El término “biocerámicas” se refiere a materiales cerámicos biocompatibles, con aplicación en usos biomédicos o clínicos. Las biocerámicas se pueden producir en estructuras cristalinas o amorfas, y se pueden clasificar en dos grupos; biocerámicas basadas en fosfatos de calcio (CaP) y biocerámicas basadas en otros materiales, los cuales incluyen la circona tetragonal estabilizada con ytria-(Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Y-TZP), la alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) y algunos vidrios y vitrocerámicos (vidrios parcialmente cristalizados) de las familias de los silicatos, silicofosfatos y de los fosfatos alcalinos y/o alcalinotérreos.

La Tabla 1.1 presenta en forma resumida la clasificación de los productos biocerámicos en términos de su composición y su forma. Dentro del grupo de los biomateriales basados en fosfatos de calcio, los más usados clínicamente son, la hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ , con  $0 \leq x \leq 1$ ) y el fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , C<sub>3</sub>P), debido en especial a su semejanza con los componentes inorgánicos de los tejidos duros de los vertebrados. En el caso del grupo de los basados en otros materiales, el uso de Y-TZP y de alúmina se debe especialmente a su excelente resistencia mecánica y tenacidad. Los vidrios y vitrocerámicos de los sistemas  $\text{SiO}_2\text{--P}_2\text{O}_5\text{--CaO--Na}_2\text{O}$  y  $\text{SiO}_2\text{--P}_2\text{O}_5\text{--CaO--MgO}$  son clasificados como vidrios y vitrocerámicos bioactivos, y son reconocidos como materiales bioactivos y bioreabsorbibles; en particular, los llamados vitrocerámicos de Apatita-Wollastonita (A-W).

**Tabla 1.1** Clasificación de los materiales biocerámicos según su composición y su forma.

Categoría	Material	Composición	Forma
Biocerámicas basadas en fosfatos de calcio (CaP)	Hidroxiapatita (HAp o HA)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	Sinterizados (densos o porosos). Polvos Recubrimientos Compuestos Fibras
	$\beta$ -fosfato tricálcico, ( $\beta$ - $\text{C}_3\text{P}$ )	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Sinterizados (densos y porosos) Polvos
	Fosfato dicálcico anhidro, (monetita, DCP o DCPA)	$\text{CaHPO}_4$	Polvos
	Fosfato dicálcico dihidratado (Brushita, DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Polvos
	Pirofosfato cálcico (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	Polvos
	$\alpha$ -fosfato tricálcico, ( $\alpha$ - $\text{C}_3\text{P}$ )	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Polvos
	Fosfato tetracálcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$	Polvos
	Fosfato Octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Polvos
	Fosfato de calcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Polvos
Biocerámicas basadas en otros materiales	Zircona tetragonal estabilizada con Ytria (Y-TZP)	$\text{ZrO}_2 - 3 \text{ mol } \% \text{Y}_2\text{O}_3$	Sinterizados (densos)
	Oxido de Aluminio (Alúmina)	$\text{Al}_2\text{O}_3$	Sinterizados (densos)
	Oxido de Titanio (Titania)	$\text{TiO}_2$	Sinterizados (densos)
	Nitruro de Silicio	$\text{Si}_3\text{N}_4$	Sinterizados (densos)
	Carburo de Silicio	$\text{SiC}$	Sinterizados (densos)
	Carbono	C	Fibras
	Sistemas vítreos bioactivos	$\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O-CaO}$	En masa
		$\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-CaO-MgO}$	En masa
		$\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Al}_2\text{O}_3$	En masa
	Sistemas vitrocerámicos bioactivos	$\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-MgO}$ (A-W)	En masa
		$\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-CaO-MgO}$ (Ceravital)	Fibras

Las aplicaciones clínicas requieren que las biocerámicas presenten diversas formas, que van desde películas delgadas y nanopolvos hasta cuerpos sinterizados, densos o porosos. Como substitutos óseos se usan compactos porosos de HAp,  $C_3P$  y sus mezclas, conocidas como BCP. Los defectos óseos que no están expuestos a altos esfuerzos pueden ser reemplazados por HAp o  $C_3P$  porosos. Biocerámicas de HAp con porosidades de 70-80% se distribuyen actualmente como productos comerciales a clínicas y hospitales. Cerámicas de Y-TZP y de alúmina de alta densidad se usan para prótesis de cadera de bola y copa, mientras que la HAp se usa en forma de películas delgadas para recubrimientos de metales duros, como en los casos de dientes y articulaciones artificiales de cadera.

### 1.3 Biocerámicas basadas en fosfato tricálcico

Las biocerámicas basadas en fosfatos de calcio se han usado satisfactoriamente en traumatología, odontología y cirugía maxilo-facial durante más de 30 años para la reparación ósea, principalmente debido a su biocompatibilidad, bioactividad y osteoconductividad<sup>(4)</sup>.

Las biocerámicas comerciales de fosfato de calcio están compuestas de hidroxiapatita, Hap,  $\beta$ - fosfato tricálcico,  $\beta$ -  $C_3P$ , o su mezcla, BCP<sup>(5 -7)</sup>.

La Hap es el fosfato menos soluble y reactivo, su estructura cristalina es la más densa de todos los fosfatos de calcio de importancia biológica. Las biocerámicas de Hap permanecen sin degradarse varios años después de su implantación.

El fosfato tricálcico ( $C_3P$ ) es el material, para implantes, más conocido entre los compuestos de fosfato de calcio. Se utiliza en cerámicas de substitución ósea, recubrimientos de prótesis metálicas, cementos y materiales compuestos. La whitlockita de magnesio, un derivado del fosfato tricálcico, se produce en calcificaciones patológicas ectópicas (cristales de articulaciones, cálculos renales, saliva y cálculos urinarios).

El fosfato tricálcico,  $Ca_3(PO_4)_2$ , existe en cinco formas diferentes, de las cuales todas, salvo el  $\alpha'$ - $Ca_3(PO_4)_2$ , se utilizan como biomaterial (Tabla 1.1). El fosfato tricálcico amorfo y el fosfato tricálcico apatítico son fases estables a bajas temperaturas que

generalmente se obtienen por precipitación, mientras que el  $\alpha$ - y  $\beta$ -fosfato tricálcico son fases cristalinas de alta temperatura.

En adelante, se especificará la estructura del fosfato tricálcico mediante la adición de un prefijo al nombre genérico  $C_3P$ , así:

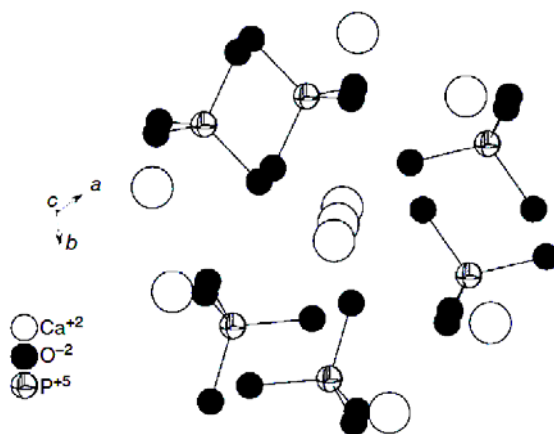
- am- $C_3P$  designará al fosfato tricálcico amorfo;
- ap- $C_3P$  designará al fosfato tricálcico apatítico;
- $\beta$ - $C_3P$ : designará el fosfato tricálcico beta;
- $\alpha$ - $C_3P$ : designará el fosfato tricálcico alfa;
- $\alpha'$ - $C_3P$ : designará el fosfato tricálcico alfa prima. Es un fosfato tricálcico que carece de interés como biomaterial pues sólo es estable a temperaturas superiores a  $\sim 1430^\circ\text{C}$ . No se discutirá en esta revisión.

### 1.3.1 El am- $C_3P$

En la década de los 70 se produjo un marcado interés por el fosfato tricálcico amorfo (am- $C_3P$ ) debido a su participación en la composición del hueso. Se generó debate y controversia sobre su formación antes de la cristalización final de una fase de tipo hidroxiapatita, durante el desarrollo óseo-mineral. Esta hipótesis fue progresivamente abandonada, y ahora se admite que la parte mineral del hueso está principalmente formada por una apatita deficiente en calcio pobremente cristalizada. Es por esto que se realizaron varias investigaciones sobre la síntesis de fosfatos que se abordarán en el capítulo 5.

Independientemente de las condiciones de síntesis, se ha demostrado que el am- $C_3P$  presenta orden atómico a corta distancia. Este orden local fue estudiado detalladamente por Posner y col. en varios trabajos<sup>(8,9)</sup>. En particular, la rápida disminución de la función de distribución radial conduce a un modelo basado en la agrupación de clústeres de iones con diámetros  $\approx 9,5 \text{ \AA}$  y una composición química  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ . La estabilidad de los clústeres de Posner ha sido confirmada mediante cálculos teóricos<sup>(10)</sup>. Estos clústers están formados por una columna central de tres iones  $\text{Ca}^{2+}$  rodeados de seis grupos fosfato  $[\text{PO}_4^{3-}]$ , la neutralidad se alcanza con seis iones  $\text{Ca}^{2+}$  adicionales distribuidos en la periferia del clúster. (Figura 1.1)

Se han identificado grupos similares en la apatita, OCP y  $C_3P$ 's cristalinos, y parecen constituir una unidad de construcción básica de los fosfatos de calcio. Eanes<sup>(11)</sup> también investigó el am- $C_3P$  a través de experimentos termoquímicos y concluyó que el fosfato de calcio amorfo correspondía a una fase de fosfato tricálcico hidratado, sugiriendo la fórmula química  $Ca_3(PO_4)_2 \cdot n(H_2O)$ . La presencia de agua es una característica intrínseca del fosfato am- $C_3P$ . Incluso liofilizado, el fosfato de calcio amorfo todavía contiene alrededor de 15-20% en peso de agua.



**Figura 1.1** Representación de un “clúster de ‘Posner’” asociado con la estructura del fosfato tricálcico amorfo. Estos clúster pueden encontrarse en la hidroxiapatita y otras fases de fosfatos cálcicos.

El am- $C_3P$  puede incorporar fácilmente iones 'foráneos' a través de sustituciones iónicas, entre los más conocidos están los iones Mg, carbonato y pirofosfato. En términos más generales, el am- $C_3P$  puede incorporar distintos cationes que exhiben actividad biológica (Sr, Zn, Mg, Mn, Cu, etc.). Recientemente, se ha demostrado que la incorporación de plata induce comportamientos antimicrobianos en el am- $C_3P$ <sup>(12)</sup>.

### 1.3.2 El ap- $C_3P$

El fosfato tricálcico apatítico (ap- $C_3P$ ) es la forma cristalina de baja temperatura del am- $C_3P$ . Presenta una estructura de apatita con una relación Ca/P cercana a 1,5. Este compuesto se obtiene de la cristalización del am- $C_3P$  en ambiente acuoso. Heughebaert demostró que la cristalización está asociada con una reacción de hidrólisis interna de los grupos  $PO_4$ <sup>(13)</sup>.





produciendo una apatita cristalina con cantidades iguales de  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{OH}^-$ , representados por la fórmula química  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_x$ , la cual tiene un aspecto de hidroxiapatita no-estequiométrica<sup>(14)</sup>.

Los espectros de difracción de rayos X (DRX) del ap- $\text{C}_3\text{P}$  son característicos de una apatita deficiente en calcio, se observan todas las bandas de la transformada de Fourier de infrarojo (FTIR) de una estructura apatítica con una banda adicional alrededor de  $875\text{ cm}^{-1}$  debida a iones  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

### 1.3.3 El $\beta\text{-C}_3\text{P}$

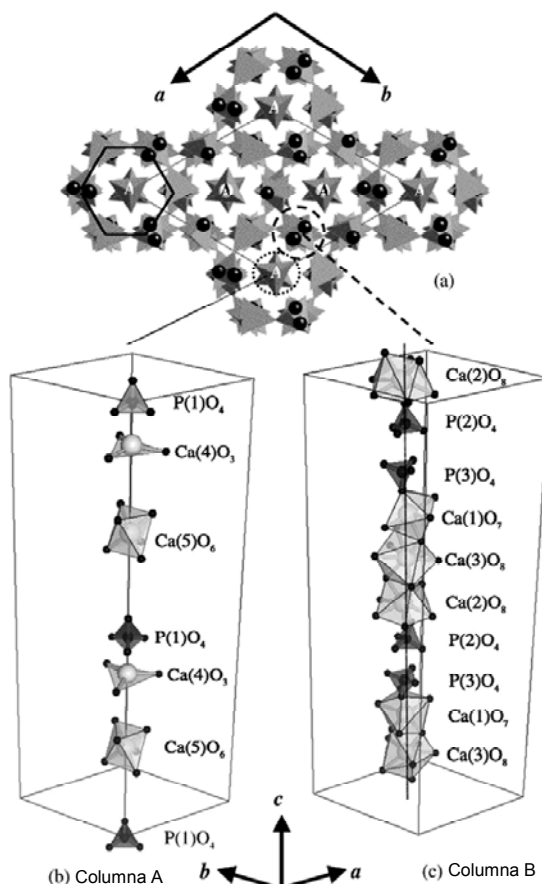
Desde el punto de vista estructural, el  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  es una fase estable de fosfato tricálcico anhidro. Los parámetros de la celdilla unidad romboédrica (grupo espacial  $\text{R}_3\text{C}$ ,  $Z = 21$ ) han sido establecidos con gran precisión por difracción de neutrones por Masatomo Yashima y col.<sup>(15)</sup>  $a = b = 10.4352 (2)\text{ \AA}$ ,  $c = 37.4029 (5)\text{ \AA}$ , y  $\alpha = \beta = 90^\circ$ , y  $\gamma = 120^\circ$  para un celdilla en configuración hexagonal. La densidad calculada es  $3,066\text{ g/cm}^3$  (ver Apéndice 1).

En la estructura de este compuesto aparecen cinco sitios de Ca con niveles de ocupación y coordinación diferentes (Apéndice 1). Estos autores confirman que el sitio de Ca (4) con las coordenadas atómicas  $[0.0, 0.0, 0.0851 (6)]$  es muy diferente de los otros cuatro sitios. El calcio en posición de Ca (4) tiene una coordinación triangular con los átomos de oxígeno, un bajo factor de ocupación de 0,43 (4), y un alto parámetro de agitación térmica isotrópica. Por el contrario los sitios de Ca (1), Ca (2), Ca (3) y Ca (5) están totalmente ocupados por un átomo de Ca y esta posición se coordina con siete, ocho, ocho y seis átomos de oxígeno, respectivamente.

Los fósforos están a su vez situados en tres sitios diferentes con un nivel de ocupación relativo 1:3:3 para el  $\text{P}(1):\text{P}(2):\text{P}(3)$ . La Figura 1.2 muestra un esquema de la estructura cristalina de  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ . Esta estructura cristalina puede describirse por la agrupación de las columnas A y B a lo largo del eje c.

Se ha encontrado que el  $\text{Ca}^{2+}$  puede ser sustituido por iones  $\text{Mg}^{2+}$  hasta en un 14% en el  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  sin alterar esencialmente la estructura, lo que conduce a una fase  $\text{Mg-}\beta\text{-}$

$C_3P^{16-18}$ . El  $Mg^{2+}$  se localiza preferentemente en sitios Ca(5) de la estructura para una sustitución de hasta el 9%.



**Figura 1.2.** Proyección de la estructura cristalina del  $\beta$ - $C_3P$  en el plano (001), mostrando las columnas A y B. A indica columna A, mientras que la columna B no se ha identificado. El rombo en (a) indica la celdilla unidad hexagonal del  $\beta$ - $C_3P$ , b) y c) indican las configuraciones de los grupos  $CaO_n$  y  $PO_4$  en las columnas A y B, respectivamente, a lo largo del eje c de la celdilla hexagonal ( $n = 3; 6, 7$ , y  $8$ ).

Otros cationes bivalentes pueden sustituir al calcio en el  $\beta$ - $C_3P$ . Entre los más interesantes están el  $Zn^{2+}$  y el  $Sr^{2+}$  (19,20). El  $Zn^{2+}$  puede sustituir a los iones de calcio hasta un 20% y el  $Sr^{2+}$  hasta un 80%.

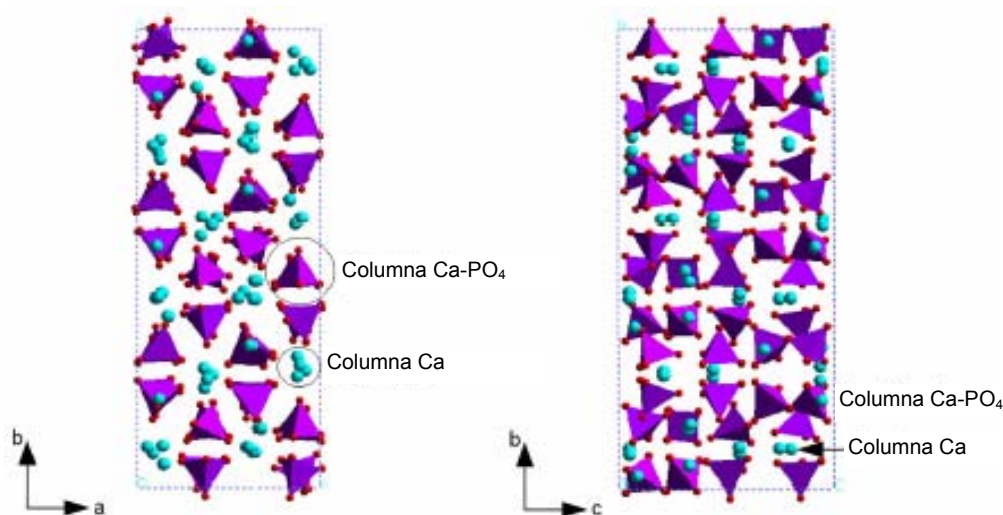
El  $\beta$ - $C_3P$  no debe confundirse con la whitlockita de magnesio,  $Ca_9Mg(HPO_4)(PO_4)_6$ , a pesar que ambas cristalizan en la misma estructura romboédrica. La Whitlockita puede prepararse en medios acuosos que contienen iones  $Mg^{2+}$  y  $HPO_4^{2-}$ . Se puede obtener por descomposición doble entre una solución de calcio y magnesio, y una solución de fosfato, a diferentes temperaturas. Una relación molar inicial de Mg/P de 0,05, a una

temperatura igual a 100°C, y pH ácido (entre 5 y 6) son las condiciones experimentales que favorecen la precipitación de whitlockita bien cristalizada. Sin embargo, durante la preparación de la whitlockita se pueden formar productos secundarios de apatita y amorfos.

### 1.3.4 El $\alpha$ -C<sub>3</sub>P

El  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, fase polimórfica con estructura hexagonal estable a baja temperatura, se transforma a temperaturas superiores a 1125 °C en el polimorfo con estructura monoclinica  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P.

El  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P cristaliza en el grupo espacial monoclinico P121/a1(14), Figura 1.3. La celda unidad se compone de 24 unidades fórmula Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub><sup>(21)</sup>. Los parámetros de la celdilla unidad son  $a = b = 12.887 (2) \text{ \AA}$ ,  $b = 27.280 (4) \text{ \AA}$ ,  $c = 15.219(2) \text{ \AA}$ , y  $\beta = 126.20 (1)^\circ$ , con su celda unidad formada por 24 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (312 átomos en total, por celda unidad).  $V = 4317.53 \text{ \AA}^3$  (Ver Apéndice 2). La densidad calculada es 2.863 g/cm<sup>3</sup>. En la estructura del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P existen 12 sitios de fósforo y 18 de Ca cristalográficamente distintos.



**Figura 1.3.** Esquemas de la estructura cristalina del polimorfo  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P. El dibujo de la izquierda corresponde a la proyección en el plano (a,b) de la celda unidad. El dibujo de la derecha corresponde a la proyección en el plano (b,c). Los tetraedros representan los grupos [PO<sub>4</sub>], mientras que las bolas color azul ciano representan los átomos de Ca (extraído de Yin y col.<sup>(22)</sup>).

La celdilla unidad del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P está formada por grupos PO<sub>4</sub> y CaO<sub>n</sub> distribuidos en columnas a lo largo de la dirección [0 0 1]. En la red del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P existen dos tipos de columnas una llamada C-C que contiene solamente cationes Ca y otra, llamada C-A, que contiene Ca<sup>2+</sup> y grupos [PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>]. Cada columna C-C está rodeada por seis columnas de C-A, y a su vez las columnas C-C y C-A se alternan de modo que seis C-C rodean a cada columna C-A <sup>(23)</sup>.

En la estructura del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P, como en la del  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, los iones Ca exhiben un amplio número de coordinación y geometrías. Todos los iones Ca en las columnas anión-cación presentan al menos 7 oxígenos vecinos, y la estructura más comúnmente observada es la de bipirámides pentagonales, con el plano ecuatorial aproximadamente perpendicular a la columna. Los números de coordinación de los iones Ca en las columnas anión-cación, son de 5 y 7 (Figura 1.3).

### 1.3.5 Algunas consideraciones sobre los fosfatos tricálcicos

Como se ha descrito previamente el Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, a presión normal, presenta tres fases polimórficas:  $\beta$ ,  $\alpha$  y  $\alpha'$ . La fase  $\alpha'$ , estable a altas temperaturas ( $\approx 1450$  °C), revierte a la fase  $\alpha$  durante el enfriamiento, mientras que las formas polimórficas  $\beta$  y  $\alpha$  son estables en el rango de temperaturas habituales en la síntesis de los fosfatos tricálcicos.

El  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, aunque se forma a altas temperaturas, es estable en un amplio rango de temperaturas, desde la temperatura ambiente hasta su temperatura de transición a  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P (1125°C). El  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P es considerada una fase metaestable a temperatura ambiente, se obtiene por una congelación de su estructura “quenching” mediante enfriamiento rápido desde su área de estabilidad térmica<sup>(24,25)</sup>; sin embargo, también aparece como una fase transitoria durante la conversión térmica del am-C<sub>3</sub>P puro en C<sub>3</sub>P cristalino en un estrecho rango de temperatura (630-850°C). La descomposición térmica del ap-C<sub>3</sub>P lleva a la fase estable  $\beta$ -C<sub>3</sub>P sin fases transitorias. Las áreas de estabilidad de los C<sub>3</sub>P's determinan su uso como biomaterial (Tabla 1.1): los cerámicos sinterizados pueden obtenerse solo desde  $\alpha$ - y  $\beta$ - C<sub>3</sub>P, los am-C<sub>3</sub>P y ap-C<sub>3</sub>P solo pueden procesarse a bajas y moderadas temperaturas y por lo tanto entran en la composición de polvos y cementos de fosfatos de calcio, en materiales compuestos

(polímeros-mineral), o en recubrimientos de baja temperatura sobre implantes metálicos.

El am-C<sub>3</sub>P y el ap-C<sub>3</sub>P pueden tener composiciones diferentes a su composición estequiométrica dependiendo de su preparación y las condiciones de calentamiento, lo que no ocurre con las fases de altas temperaturas, sobre las que no hay publicaciones con referencia a su no-estequiometría. Sin embargo, en todas las fases C<sub>3</sub>P son varias las substituciones iónicas posibles, en esta revisión se considerarán sólo las que tienen interés biológico.

Todos los C<sub>3</sub>P's son más solubles que la hidroxiapatita estequiométrica; sin embargo, en el caso de los am- y ap-C<sub>3</sub>P no se ha determinado un producto de solubilidad específico. Si se tiene en cuenta el concepto general que la bioreabsorbilidad de los fosfatos de calcio está determinada por su solubilidad, todos son bioreabsorbibles<sup>(26)</sup>.

Adicionalmente a su bioreabsorbilidad, algunos compuestos de C<sub>3</sub>P, especialmente el am-C<sub>3</sub>P y el ap-C<sub>3</sub>P, exhiben muy alta reactividad en medio acuoso y pueden ser transformados rápidamente en apatita. Estas rápidas reacciones de hidrólisis son usadas en el auto-ajuste de cementos y, cuando ocurre *in vivo*, forman cristales de carbonato apatita neo-formada análoga a los cristales de hueso mineral responsables de la actividad biológica. El am-C<sub>3</sub>P y el α-C<sub>3</sub>P no son estables en condiciones fisiológicas, se disuelven espontáneamente y/o hidrolizan en apatita de baja cristalinidad similar al hueso mineral. El ap-C<sub>3</sub>P está en el rango de solubilidad del hueso y se comporta de manera similar al mineral óseo. El β-C<sub>3</sub>P teóricamente no se disolverá espontáneamente *in vivo*, ni se hidrolizará a apatita en ausencia de actividad celular. Estos hechos determinan el comportamiento de los C<sub>3</sub>P's puros; sin embargo, se pueden observar algunas alteraciones a estos comportamientos dependiendo de su composición química, y sus características estructurales y microestructurales.

#### **1.4 Soluciones solidas en los fosfatos cálcicos**

En los minerales del hueso pueden estar a nivel de trazas Na, Mg, K, Zn, Fe, Cu, y Sr. Estos oligoelementos juegan un papel en el rendimiento general de los huesos y su incorporación en los implantes puede afectar favorablemente su biocompatibilidad. Puesto que como ya se ha mencionado, todas las fases de C<sub>3</sub>P son susceptibles de

sustituciones iónicas, el dopado del fosfato tricálcico con varios elementos ha sido estudiado por diversos investigadores en busca de modificar tanto propiedades físicas, como mecánicas y biológicas. Las propiedades estudiadas han sido principalmente la resistencia mecánica, la solubilidad y la biocompatibilidad (cultivos celulares). Los elementos más estudiados en el dopado de las cerámicas de fosfato tricálcico son cationes bivalentes como el Mg y el Zn y monovalentes como el Li, K y Na que entran en solución sólida sustituyendo al Ca en las posiciones (Ca4).

Por otro lado el Si, que forma agrupaciones tetraédricas con el oxígeno puede sustituir al P que forma agrupaciones tetraédricas similares.

La introducción de elementos dopantes influye significativamente sobre la adhesión, proliferación y diferenciación celular del precursor osteoblástico sobre estos materiales. En particular, el silicio<sup>(27 - 33)</sup> y el magnesio<sup>(34 - 40)</sup> han recibido gran atención como dopantes en los fosfatos de calcio para usos biomédicos, expresamente en HAp y C<sub>3</sub>P.

### 1.4.1 ¿Por qué adicionar silicio y magnesio a los fosfatos tricálcicos?

El silicio desempeña un papel esencial en la formación de hueso; de hecho, se ha demostrado que los iones de silicio están implicados en el proceso de calcificación de los huesos jóvenes<sup>(41)</sup>. Por lo tanto, la presencia de silicio en las cerámicas y vidrios bioactivos tiene un efecto significativo en el proceso de osteogénesis. De hecho, se ha demostrado que la incorporación de silicio en apatitas induce la formación de una mayor cantidad de tejido óseo que las apatitas no dopadas<sup>(33)</sup>. Además, el silicio mejora la bioactividad de los materiales mediante la formación de grupos Si-OH (silanol) sobre la superficie del material. Estos grupos facilitan la nucleación y la formación de capas de apatita sobre la superficie promoviendo la unión material-hueso<sup>(42)</sup>.

Por otra parte, se ha probado que la restricción dietaria de Mg, sea severa o moderada, causa velocidades sumamente deprimidas de formación y de reabsorción de hueso, y afecta el desarrollo normal de hueso y la resistencia del hueso en ratas jóvenes<sup>(43)</sup>. Alternativamente, las formulaciones de cementos inyectables de fosfatos de calcio con adiciones de Mg son eficaces en la mejora de las propiedades del hueso de ratas ovariectomizadas y pueden ser útiles en la terapia de osteoporosis<sup>(35)</sup>.

Además, los ensayos clínicos han mostrado que la entrada adecuada de Mg reduce la velocidad de la osteoporosis menopáusica y previene el inicio de la osteoporosis senil en los humanos<sup>(44)</sup>. Se han realizado muchos intentos de introducir Si y Mg en la red de Hap como un modo de mejorar el nivel de bioactividad del material.<sup>(27,28,30-34,38,45-61)</sup>

Es bien conocido que el Mg cambia significativamente el margen de estabilidad de la fase  $\beta$ -C<sub>3</sub>P<sup>(16,36)</sup>, y por otro lado el dopado con Mg ha sido propuesto como una vía para mejorar la resistencia mecánica de biocerámicos de C<sub>3</sub>P<sup>(16,59)</sup>. Por otra parte, el Si juega papeles similares con respecto a la fase  $\alpha$ <sup>(60 - 63)</sup>. La disolución y la velocidad de biodegradación de fosfatos de calcio puede estar fuertemente influenciada por la presencia de Mg y Si<sup>(33,37,52)</sup>.

### 1.5 Aplicaciones y usos de las biocerámicas basadas en C<sub>3</sub>P

Desde los primeros ensayos de implantes, el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P se ha convertido en uno de los primeros fosfatos de calcio en ser utilizados en biocerámicas para sustitución y reparación ósea gracias a su estabilidad a altas temperaturas y la facilidad de procesamiento como cerámica<sup>(64- 66)</sup>. Las cerámicas basadas en  $\beta$ -C<sub>3</sub>P han sido comercializadas durante mucho tiempo y son uno de los principales sustitutos óseos sintéticos bioabsorbibles en uso hoy en día por los cirujanos ortopédicos y dentistas en su práctica cotidiana. Estos materiales se presentan en forma de gránulos y de piezas de cerámica porosa. Se utilizan en la reconstrucción de todo tipo de defectos óseos, desde el aumento de los defectos del reborde alveolar tras la extracción del diente y antes de la colocación del implante, hasta la reconstrucción del seno maxilar<sup>(67,68)</sup>, la corrección de diversas deformidades, y la reconstrucción ósea después de una lesión o enfermedad<sup>(69)</sup>. Más recientemente, el  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P, también se ha presentado como material cerámico para aplicaciones similares<sup>(70)</sup>.

Las cerámicas basadas en  $\beta$ -C<sub>3</sub>P son bioabsorbibles y son reemplazadas por hueso, mientras que las cerámicas basadas en HAp constituyen materiales que son muy poco o no biodegradables. Las cerámicas de fosfato de calcio bifásico (BCP), que asocian estos dos fosfatos de calcio de alta temperatura, permiten controlar la tasa de reabsorción de las biocerámicas y se ha publicado que ofrecen mejores propiedades biológicas<sup>(71)</sup>. Recientemente, se ha propuesto un nuevo fosfato tricálcico bifásico

biodegradable asociando  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P y  $\beta$ -C<sub>3</sub>P. Esta mezcla de fases de C<sub>3</sub>P se obtiene calentando un precursor de am-C<sub>3</sub>P a 800° C<sup>(72)</sup>.

El desarrollo de los cementos de fosfato de calcio<sup>(73)</sup>, actualmente la segunda aplicación en orden de importancia de los materiales de C<sub>3</sub>P, ha dado lugar a un significativo salto tecnológico en el campo de las biocerámicas. Estos materiales son capaces de endurecerse, una vez implantados en el cuerpo vivo, y la mayoría pueden ser inyectados. A pesar de sus pobres propiedades mecánicas, se utilizan en la práctica clínica cada vez más por su facilidad de implante. El fosfato tricálcico en sus diversas formas (am-,  $\alpha$ - o  $\beta$ -C<sub>3</sub>P) está involucrado en muchas composiciones de cemento de fosfato de calcio, y muchos de ellos se comercializan. El am-C<sub>3</sub>P y el  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P se utilizan en varias composiciones de cemento por sus rápidas reacciones de hidrólisis que conducen a la formación de nanocristales de apatita entrelazados y pobremente cristalizados, que dan lugar a los procesos de endurecimiento de estos cementos.

El  $\beta$ -C<sub>3</sub>P es el principal constituyente de los cementos de fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) y en ocasiones es usado como un aditivo inerte en otros tipos de cementos de Ca-P. Los usos de los cementos inyectables han progresado en los últimos años, sobre todo en odontología y en el relleno de defectos óseos. Sin embargo, una de sus principales desventajas en comparación con las cerámicas es la preparación de la pasta y, en general, la ausencia de macroporos que previenen la invasión celular, mientras que la principal ventaja de su uso es su capacidad de llenar cualquier tipo de defecto óseo y su inyectabilidad, permitiendo finos procedimientos quirúrgicos.

Los compuestos de C<sub>3</sub>P (principalmente  $\alpha$ -,  $\beta$ -C<sub>3</sub>P y am-C<sub>3</sub>P) se utilizan también como sustancias de liberación de iones minerales en materiales poliméricos, aunque tales composites han tenido pocas aplicaciones comerciales.

Hoy en día el  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha$ -C<sub>3</sub>P,  $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) está recibiendo cada vez mayor atención como materia prima en la formulación de diversos cementos inyectables, biocerámicas biodegradables y materiales compuestos para la reparación ósea.<sup>(74)</sup>



Nuevos retos:

La principal desventaja de los materiales de fosfato tricálcico es su baja resistencia mecánica, que limita su aplicación a situaciones en que el implante no esté sometido a grandes esfuerzos mecánicos.

Por otra parte, como se indica en los párrafos previos, distintos autores han demostrado que aquellos materiales capaces de aportar silicio al medio biológico inducen una respuesta osteogénica<sup>(27-33)</sup>. Esto ha conducido a intentos de síntesis de materiales de fosfato tricálcico con sílice en su estructura con objeto de mejorar la osteogénesis del implante.

El reto investigador es el desarrollo de materiales de fosfato tricálcico con silicio y/o magnesio en solución sólida con mineralogía y microestructura controlada con objeto de obtener materiales monolíticos con propiedades mecánicas mejoradas.

## Referencias

- <sup>1</sup> R. Sastre, S. De Aza y J. San Román. "Biomateriales". Editado por CYTED; pp 522 (2004).
- <sup>2</sup> Vallet-Regí, M. González-Calbet J. M. "Calcium phosphates as substitution of bone tissues" *Progress in Solid State Chemistry* 32 1–31 2004
- <sup>3</sup> L. R. Meseguer Olmo, V. Vicente Ortega, M. Alcaraz Baños, J. Rodríguez Vicente, A. Galian Canovas, M. Clavel-Sainz Nolla, "Osteointegración de la cerámica porosa de  $\beta$ -Whitlockite", *Rev Ortop Traumatol*; 39, 528-533. (1995).
- <sup>4</sup> L. L. Hench, "Bioceramics", *J. Am. Ceram. Soc.*, 81 [7] 1705-1728 (1998).
- <sup>5</sup> P. N. De Aza, A. H. De Aza, and S. De Aza, "Crystalline bioceramic materials", *Bol.Soc. Esp. Ceram.*, 44 [3] 135-145 (2005).
- <sup>6</sup> S. V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphates", *J. Mater. Sci.*, 42 [4] 1061-1095 (2007).
- <sup>7</sup> R. Z. LeGeros, S. Lin, R. Rohanizadeh, D. Mijares, and J. P. LeGeros, "Biphasic calcium phosphate bioceramics: Preparation, properties and applications", *J. Mater.Sci.: Mater. Med.*, 14, 201-209 (2003).
- <sup>8</sup> F. Betts, A. F. Posner, "Structural model for amorphous calcium phosphate", *Trans Am Crystal Assoc*, 10, 73–84 (1974).
- <sup>9</sup> F. Betts, A. F. Posner, "X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate", *Mater Res Bull*, 9 [3], 353–360 (1974).
- <sup>10</sup> G. Treboux, P. Layrolle, N. Kanzaki, K. Onuma, A. Ito, "Existence of Posner's cluster in vacuum", *J Phys Chem A*, 104, 5111–5114 (2000).
- <sup>11</sup> E. D. Eanes, "Thermochemical studies on amorphous calcium phosphate", *Calcif Tissue Res*, 5 [2], 133–145 (1970).
- <sup>12</sup> O. J. Aimanova, R. Z. Legeros, V. A. Sinyayev, "Antimicrobiologic properties of hydrated amorphous calcium phosphates containing silver", *Key Eng Mater*, 284–286, 439–442 (2005).
- <sup>13</sup> J. C. Heughebaert, G. Montel, "Conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatitic tricalcium phosphate", *Calcif Tissue Int*, 34, S103-S108 (1982).
- <sup>14</sup> C. Rey, C. Combes, C. Drouet, H. Sfihi, A. Barroug, "Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: implications for biominerals and biomaterials", *Mat Sci Eng C*, 27, 198–205 (2007).
- <sup>15</sup> M. Yashima, A. Sakai, T. Kamiyama, A. Hoshikawa. "Crystal structure analysis of beta-tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  by neutron powder diffraction". *Journal of Solid State Chemistry*, 175, 272-277 (2003).

- 
- <sup>16</sup> R. G. Carrodeguas, A. H. De Aza, X. Turrillas, P. Pena, and S. De Aza, "New approach to the  $\alpha$ - $\beta$  polymorphic transformation in magnesium-substituted tricalcium phosphate and its practical implications", *J. Am. Ceram. Soc.*, 91 [4] 1281-1286 (2008).
- <sup>17</sup> R. A. Terpstra, F. C. M. Driessens, H. G. Schaeken, R. M. H. Verbeeck. "The whitlockite phase in the system CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO at 1000 °C", *Z Anorg Allg Chem*, 507, 206–212 (1983).
- <sup>18</sup> D. Clement, J. M. Tristan, M. Hamad, P. Roux, J. C. Heughebaert, "Etude de la substitution Mg<sup>2+</sup>/Ca<sup>2+</sup> dans l'orthophosphate tricalcique  $\beta$ ", *J Solid State Chem*, 78, 271–280 (1989).
- <sup>19</sup> A. Bigi, E. Foresti, M. Gandolfi, M. Gazzano, N. Roveri. "Isomorphous substitution in  $\beta$ -tricalcium phosphate: the different effects of zinc and strontium" *J Inorg Biochem*, 66, 259–265 (1997).
- <sup>20</sup> A. Ito, K. Ojima, H. Naito, N. Ichinose, T. Tateishi, "Preparation, solubility and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphates ceramics", *J Biomed Mater Res*, 50, 178–183 (2000).
- <sup>21</sup> Mathew, M.;Schroeder, L.W.;Dickens, B.;Brown, W.E. "The crystal structure of alpha-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Golden Book of Phase Transitions, Wroclaw (2002) 1, 1-123 y *Acta Crystallographica B* 33, 1325-1333 (1977).
- <sup>22</sup> X. Yin, M. J. Stott, A. Rubio " $\alpha$  and  $\beta$  tricalcium phosphate: a density functional study". *Physical review B* 68, 205205 (2003).
- <sup>23</sup> M. Mathew, L. W. Schroeder, B. Dickens, W.E. Brown, "The crystal structure of alpha-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>", *Acta Crystallographica B* 33, 1325-1333 (1977).
- <sup>24</sup> M. J. Buerger, "The role of temperature in mineralogy", *Amer. Mineral.*, 33 [3-4] 101-121 (1948).
- <sup>25</sup> M. J. Buerger, "Crystallographic aspects of phase transformations"; pp. 183-211 in *Phase transformations in solids*. Edited by R. Smoluchowski, J. E. Meyer, and W. A. Weyl. John Wiley & Sons, Inc., New York, (1951).
- <sup>26</sup> R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros, G. Daculsi, R. Kijkowska, "Calcium phosphate biomaterials: preparation, properties and biodegradation", In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering*, DB Wise et al. (editors), New York: Marcel Dekker, 1429–1463 (1995).
- <sup>27</sup> S. M. Best, S. Zou, R. Brooks, J. Huang, N. Rushton, and W. Bonfield, "The osteogenic behaviour of silicon substituted hydroxyapatite", *Key Eng. Mater.*, 361-363 985-988 (2008).

- 
- <sup>28</sup> E. S. Thian, J. Huang, S. M. Best, Z. H. Barber, and W. Bonfield, "Silicon-substituted hydroxyapatite: The next generation of bioactive coatings", *Mat. Sci. Eng., C*, 27 [2] 251-256 (2007).
- <sup>29</sup> S. V. Dorozhkin, "In vitro mineralization of silicon containing calcium phosphate bioceramics", *J. Am. Ceram. Soc.*, 90 [1] 244-249 (2007).
- <sup>30</sup> C. M. Botelho, R. A. Brooks, S. M. Best, M. A. Lopes, J. D. Santos, N. Rushton, and W. Bonfield, "Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite", *J. Biomed. Mater. Res. A*, 79A [3] 723-730 (2006).
- <sup>31</sup> E. S. Thian, J. Huang, M. E. Vickers, S. M. Best, Z. H. Barber, and W. Bonfield, "Silicon-substituted hydroxyapatite (SiHA): A novel calcium phosphate coating for biomedical applications", *J. Mater. Sci.*, 41 [3] 709-717 (2006).
- <sup>32</sup> A. E. Porter, N. Patel, J. N. Skepper, S. M. Best, and W. Bonfield, "Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface", *Biomaterials*, 25 [16] 3303-3314 (2004).
- <sup>33</sup> A. E. Porter, N. Patel, J. N. Skepper, S. M. Best, and W. Bonfield, "Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics", *Biomaterials*, 24 [25] 4609-4620 (2003).
- <sup>34</sup> E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri, and S. Sprio, "Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 19 239-247 (2008).
- <sup>35</sup> M. Otsuka, A. Oshinbe, R. Z. Legeros, Y. Tokudome, A. Ito, K. Otsuka, and W. I. Higuchi, "Efficacy of the injectable calcium phosphate ceramics suspensions containing magnesium, zinc and fluoride on the bone mineral deficiency in ovariectomized rats", *J. Pharm. Sci.*, 97 421-432 (2008).
- <sup>36</sup> J. Marchi, A. C. Dantas, P. Greil, J. C. Bressiani, A. H. A. Bressiani, and F. A. Muller, "Influence of Mg-substitution on the physicochemical properties of calcium phosphate powders", *Mater. Res. Bull.*, 42 [6] 1040-1050 (2007).
- <sup>37</sup> A. Bandyopadhyay, S. Bernard, W. Xue, and S. Bose, "Calcium phosphate-based resorbable ceramics: Influence of MgO, ZnO, and SiO<sub>2</sub> dopants", *J. Am. Ceram. Soc.*, 89 [9] 2675-2688 (2006).
- <sup>38</sup> Z. Zyman, M. Tkachenko, M. Eppe, M. Polyakov, and M. Naboka, "Magnesium substituted hydroxyapatite ceramics", *Materialwiss. Werkstofftech.*, 37 [6] 474-477 (2006).

- 
- <sup>39</sup> P. A. Revell, E. Damien, X. S. Zhang, P. Evans, and C. R. Howlett, "The effect of magnesium ions on bone bonding to hydroxyapatite coating on titanium alloy implants", *Key Eng. Mater.*, 254-2, 447-450 (2004).
- <sup>40</sup> I. Manjubala and T. S. S. Kumar, "Preparation of biphasic calcium phosphate doped with magnesium fluoride for osteoporotic applications", *J. Mater. Sci. Lett.*, 20 [13] 1225-1227 (2001).
- <sup>41</sup> Carlisle, E. M. "Silicon: a possible factor in bone calcification". *Science* 167, 279–280. (1970).
- <sup>42</sup> M Navarro, A Michiardi, O Castaño and J.A Planell. "Biomaterials in orthopaedics". *J. R. Soc. Interface* 2008 5, 1137-1158 (2008).
- <sup>43</sup> A. Creedon, A. Flynn, and K. Cashman, "The effect of moderately and severely restricted dietary magnesium intakes on bone composition and bone metabolism in the rat", *Br. J. Nutr.*, 82 63–71 (1999).
- <sup>44</sup> G. Stendig-Lindberg, "The Israeli Society for Research on Magnesium in Biology and Medicine: Proceedings of the first meeting", *I. M. A. J.*, 3 783-786 (2001).
- <sup>45</sup> C. M. Botelho, R. A. Brooks, S. M. Best, M. A. Lopes, J. D. Santos, N. Rushton, and W. Bonfield, "Biological and physical-chemical characterization of phase pure HA and SI-substituted hydroxyapatite by different microscopy techniques", *Key Eng. Mater.*, 254-2 845-848 (2004).
- <sup>46</sup> S. Ben Abdelkader, I. Khattech, C. Rey, and M. Jemal, "Synthesis, characterization and thermochemistry of calcium-magnesium hydroxyapatite and fluorapatite" *Thermochim. Acta*, 376 [1] 25-36 (2001).
- <sup>47</sup> C. W. Chen, W. Suchanek, P. Shuk, R. E. Riman, K. Brown, K. S. TenHuisen, and V. F. Janas, "Mechanochemical-hydrothermal synthesis of magnesium-substituted hydroxyapatite nanocrystals" *Abs. Pap. Am. Chem. Soc.*, 225 U48-U48 (2003).
- <sup>48</sup> I. V. Fadeev, L. I. Shvorneva, S. M. Barinov, and V. P. Orlovskii, "Synthesis and structure of magnesium-substituted hydroxyapatite" *Inorg. Mater.*, 39 [9] 947-950 (2003).
- <sup>49</sup> I. R. Gibson, S. M. Best, and W. Bonfield, "Effect of silicon substitution on the sintering and microstructure of hydroxyapatite", *J. Am. Ceram. Soc.*, 85 [11] 2771-2777 (2002).
- <sup>50</sup> S. J. Kalita and H. A. Bhatt, "Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: Synthesis and characterization", *Mat. Sci. Eng., C*, 27 [4] 837-848 (2007).

- 
- <sup>51</sup> A. E. Porter, S. M. Best, and W. Bonfield, "Ultrastructural characterisation of hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite", *Key Eng. Mater.*, 240-2 505-508 (2003).
- <sup>52</sup> A. E. Porter, C. M. Botelho, M. A. Lopes, J. D. Santos, S. M. Best, and W. Bonfield, "Ultrastructural comparison of dissolution and apatite precipitation on hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite in vitro and in vivo", *J. Biomed. Mater. Res. A*, 69A [4] 670-679 (2004).
- <sup>53</sup> A. Tampieri, G. Celotti, E. Landi, and M. Sandri, "Magnesium doped hydroxyapatite: Synthesis and characterization", *Euro Ceramics VIII, Pts 1-3*, 264-268 2051-2054 (2004).
- <sup>54</sup> I. Teoreanu, M. Preda, and A. Melinescu, "The sintering of hydroxyapatite with magnesium oxide adding", *Rev. Chim. (Bucharest)*, 56 [12] 1205-1209 (2005).
- <sup>55</sup> E. S. Thian, J. Huang, S. Best, Z. H. Barber, and W. Bonfield, "Silicon-substituted hydroxyapatite thin films: Effect of annealing temperature on coating stability and bioactivity", *J. Biomed. Mater. Res. A*, 78A [1] 121-128 (2006).
- <sup>56</sup> E. S. Thian, J. Huang, S. M. Best, Z. H. Barber, and W. Bonfield, "Novel silicodoped hydroxyapatite (Si-HA) for biomedical coatings: An in vitro study using acellular simulated body fluid", *J. Biomed. Mater. Res. B*, 76B [2] 326-333 (2006).
- <sup>57</sup> E. S. Thian, J. Huang, S. M. Best, Z. H. Barber, R. A. Brooks, N. Rushton, and W. Bonfield, "The response of osteoblasts to nanocrystalline silicon-substituted hydroxyapatite thin films", *Biomaterials*, 27 [13] 2692-2698 (2006).
- <sup>58</sup> J. Vandiver, D. Dean, N. Patel, C. Botelho, S. Best, J. D. Santos, M. A. Lopes, W. Bonfield, and C. Ortiz, "Silicon addition to hydroxyapatite increases nanoscale electrostatic, van der Waals, and adhesive interactions", *J. Biomed. Mater. Res. A*, 78A [2] 352-363 (2006).
- <sup>59</sup> K. Yoshida, N. Kondo, and H. Kita, "Effect of Substitutional Monovalent and Divalent Metal Ions on Mechanical Properties of  $\beta$ -Tricalcium Phosphate", *J. Am. Ceram. Soc.*, 88 [8] 2315-2318 (2005).
- <sup>60</sup> A. Pietak, J. Reid, M. J. Stott, and M. Sayer, "Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics", *Biomaterials*, 28 4023-4032 (2007).
- <sup>61</sup> J. W. Reid, A. Pietak, M. Sayer, D. Dunfield, and T. J. N. Smith, "Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system" *Biomaterials*, 26 2887-2897 (2005).

- 
- <sup>62</sup> J. W. Reid, L. Tuck, M. Sayer, K. Fargo, and J. A. Hendry, "Synthesis and characterization of single-phase silicon-substituted  $\alpha$ -tricalcium phosphate", *Biomaterials*, 27 2916-2925 (2006).
- <sup>63</sup> S. Langstaff, M. Sayer, T. Smith, and S. Pugh, "Resorbable synthetic bone grafts formed from a silicon stabilized calcium phosphate bioceramic"; 313-318 in *Proceedings of the Biomedical Materials: Drug Delivery, Implants and Tissue Engineering*, MRS Symposium Proceedings. Edited by T. Neenan, M. Marcolongo, and R. Valentini. (1999).
- <sup>64</sup> Nery E B, Lynch K L, Hirthe W M, Mueller K H, "Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects", *J Periodontol*, 46, 328–347 (1975).
- <sup>65</sup> Jarcho M, Salsbury R L, Thomas M B, Doremus R H, "Synthesis and fabrication of  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics for potential prosthetic applications", *J Mater Sci*, 14, 142–150 (1979).
- <sup>66</sup> Metsger D S, Driskell T D, Paulsrud J R, "Tricalcium phosphate ceramic – a resorbable bone implant: review and current status", *J Am Dent Assoc*, 105, 1035–1038 (1982).
- <sup>67</sup> Horch H H, Sader R, Pautke C, Neff A, Deppe H, Kolk A, "Synthetic pure-phase beta-tricalcium phosphate ceramic granules (Cerasorb®) for bone regeneration in the reconstructive surgery of the jaws", *Int J Oral Maxillofac Surg*, 35, 708–713 (2006).
- <sup>68</sup> G. Szabo, L. Huys, P. Coulthard, C. Maiorana, U. Garagiola, J. Barabas, Z. Nemeth, K. Hrabak, Z. Suba, "A prospective multicenter randomized clinical trial of autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevation: histologic and histomorphometric evaluation", *Int J Oral Maxillifac Implants*, 20, 371–381 (2005).
- <sup>69</sup> Ogoose A, Hotta T, Kawashima H, Kondo N, Gu W, Kamura T, Endo N, 'Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors', *J Biomed Mater Res B Appl Biomat*, 72, 94– 101(2005).
- <sup>70</sup> Almirall A, Larrecq G, Delgado J A, Martinez S, Planell J A, Ginebra M P, "Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an  $\alpha$ -TCP paste", *Biomaterials*, 25, 3671–3680 (2004).
- <sup>71</sup> Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P, "Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics", *J Mater Sci Mater Med*, 14, 195–200 (2003).

---

<sup>72</sup> Li Y, Weng W, Tam K C, “Novel highly biodegradable biphasic tricalcium phosphates composed by  $\alpha$ -tricalcium phosphate and  $\beta$ -tricalcium phosphate”, *Acta Biomater*, 3, 251–254 (2007).

<sup>73</sup> Brown W E, Chow L C “A new calcium phosphate water-setting cemen”, *In: Cement Research Progress*, Brown P (editor), Westerville OH: American Ceramic Society, 351–379 (1987).

<sup>74</sup> R. G. Carrodegua, S. De Aza. “ $\alpha$ -Tricalcium Phosphate: Synthesis, Properties and Biomedical Applications”, *Acta Biomaterialia*, 7, 3536-3546 (2011)



## **Capítulo 2**

# **HIPOTESIS Y PROPÓSITO DE LA TESIS**



Haciendo un breve resumen del capítulo de introducción se puede concluir que los biocerámicas de fosfato tricálcico son de amplio uso como biomateriales, pero debido a sus pobres propiedades mecánicas solo se pueden utilizar en sitios donde no soporten cargas. Como posibles alternativas a mejorar las propiedades mecánicas e incluso las químicas y biológicas, se ha propuesto y estudiado el dopado de los materiales de fosfato tricálcico, con diversos iones, entre los que se encuentran el Mg y el Si. Son abundantes los estudios de materiales de  $C_3P$  dopados con pequeñas cantidades de Mg o Si, sin embargo, no hay estudios sistemáticos en los que se haya estudiado el efecto conjunto de ambos elementos.

Por tanto, en este trabajo se tiene como hipótesis que los fosfatos de calcio con sustituciones de Mg y Si en forma conjunta y controlada, ya sea a nivel de trazas y/o en composiciones adecuadas, son serios candidatos para la síntesis de biocerámicos con propiedades físico-químicas, mecánicas y biológicas mejoradas. Los materiales obtenidos deberían soportar mayores cargas de manera que puedan ser utilizados en condiciones de mayores prestaciones mecánicas y ser biodegradables para proporcionar los niveles adecuados de iones de Si, Ca, P y Mg al ambiente biológico y celular al ser substituidos por el nuevo tejido óseo.

Teniendo en cuenta lo expuesto en los párrafos anteriores, se considera como propósito de este trabajo diseñar, sintetizar y caracterizar materiales densos de fosfato tricálcico dopados con Si y Mg, con el fin de que puedan ser usados como biomateriales con propiedades mecánicas y biológicas mejoradas. En la consecución de este objetivo general se requiere lograr los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar el sistema fosfato tricálcico ( $Ca_3(PO_4)_2$ ) - dióxido ( $CaMg(SiO_3)_2$ ), con objeto de establecer, en función de la temperatura y la composición, los rangos de estabilidad de los polimorfos del fosfato tricálcico en dicho sistema.
2. Sintetizar polvos altamente reactivos precursores de  $\beta$  y  $\alpha$ -fosfato tricálcico. Se abordará la síntesis de fosfatos de calcio:
  - 2.1 Puros por *solución-precipitación* y
  - 2.2 Dopados con Si y Mg por *reacción en estado sólido de mezclas estequiométricas activadas mediante la molienda de atrición de alta energía*.

3. Desarrollar, obtener y caracterizar materiales cerámicos con microestructuras controladas y propiedades mecánicas optimizadas.
  - 3.1 Con la información suministrada por el sistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  -  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ , formular distintas composiciones que generen materiales de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\alpha+\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  +  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ .
  - 3.2 Optimizar el procesamiento de los polvos de  $\text{C}_3\text{P}$  para obtener compactos densos de  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\alpha+\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  +  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ .
  - 3.3 Caracterizar microestructural y mecánicamente los compactos obtenidos.
4. Estudiar el comportamiento biológico *in vitro* de los materiales desarrollados.
  - 4.1 Ensayos de solubilidad soluciones tamponadas de a) Tris-HCl y b) suero fisiológico artificial (SFA).
  - 4.2 Cultivos celulares de células procedentes de un cultivo primario de osteoblastos humanos.

### **Capítulo 3**

## **MATERIAS PRIMAS, METODOS Y TECNICAS EXPERIMENTALES**



En el presente capítulo se presentan las condiciones de ensayo de las técnicas experimentales usadas durante el desarrollo de la investigación correspondiente a esta tesis. En cada uno de los capítulos se explica con claridad el procedimiento experimental específico utilizado.

Adicionalmente se presentan las condiciones de los estudios de propiedades mecánicas y los estudios de la biocompatibilidad *in vitro*. Se ha incluido la metodología empleada en la siembra, mantenimiento y manejo de los cultivos celulares, así como los protocolos de los diferentes ensayos usados en el estudio de la interacción *in vitro* de los materiales con sistemas biológicos.

Al finalizar se presenta la caracterización de las materias primas utilizadas durante el desarrollo de la investigación.

### **3.1 Métodos y Técnicas Experimentales**

En esta sección se presentan únicamente las condiciones de ensayo de las técnicas experimentales más ampliamente utilizadas durante el desarrollo de la tesis, aquellas técnicas que fueron usadas en forma esporádica, como por ejemplo, la determinación de la rugosidad superficial y la determinación de la densidad óptica en el estudio de cultivos celulares se especifican directamente en el capítulo experimental donde se utilizaron.

#### **3.1.1. Análisis químico por Fluorescencia de Rayos X (FRX) y espectrometría de plasma (ICP-EOS)**

El análisis químico de las muestras sólidas se ha realizado por Fluorescencia de Rayos X, utilizando un espectrofotómetro MagiX PW 2424 (Philips, Holanda) con un tubo de rayos X de rodio. Las muestras en polvo a estudiar se han preparado utilizando el método de la perla, en una perladora Per'l X 3 de Philips programada que permite fijar parámetros como el tiempo de precalcación, fusión, velocidad, ángulo de agitación, ángulo de vaciado y tiempo de colada con lo que se consigue una gran precisión en la preparación de las perlas. Las perlas se han preparado por fusión, a 1100°C durante 2 minutos, de una mezcla homogénea de 0,3 g de la muestra problema con 5,5 g de  $\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$  anhidro en un crisol de Pt-Au (95-5) de 40 mm de diámetro y 50 ml de capacidad. El fundido se ha colado en un molde de Pt-Au de la misma composición que el crisol. El espectrómetro está equipado con el software

analítico IQ+ que permite el análisis cualitativo y cuantitativo de las muestras, esta aplicación incluye los parámetros necesarios para los cálculos correspondientes a corrección inter-elemental. Los valores obtenidos se han corregido con las correspondientes curvas de calibrado obtenidas utilizando patrones certificados de fosfatos de calcio y silicatos de calcio.

El análisis químico de muestras en solución en el suero fisiológico artificial (SFA) y en la solución Tris-HCl se realizó mediante la técnica de Espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES). El estudio se ha realizado empleando un equipo de análisis multielemental de la casa Thermo-Jarrel Ash (modelo Iris Advantage, U.S.A.) con sistema de visualización axial y óptica auxiliar.

Estas técnicas fueron usadas durante la caracterización de las materias primas (Capítulo 3), caracterización de los polvos sintetizados (Capítulo 5), caracterización de los compactos obtenidos (Capítulo 6) y en el estudio de solubilidad (Capítulo 7).

#### **3.1.2 Caracterización física del material particulado**

La superficie específica de las materias primas y de los polvos sintetizados se ha determinado por el método cromatográfico (Monosorb Surface Area Analyzer MS-13, Quantachrome Corporation) usando BET isotérmico.

La distribución del tamaño de partícula se ha medido usando un analizador de tamaño de laser (Master Sizer S; Malvern Instruments, UK). Todas las medidas de tamaño de partícula fueron realizadas con dispersión y desaglomeración de los polvos usando ultrasonidos antes de la medida. La densidad real de los polvos se ha medido por picnometría de He.

Estas técnicas fueron usadas durante la caracterización de las materias primas (Capítulo 3), caracterización de los polvos sintetizados (Capítulo 5) y en la caracterización de los polvos en el estudio de solubilidad (Capítulo 7).

#### **3.1.3. Difracción de Rayos X (DRX)**

La identificación de las fases cristalinas presentes en las materias primas y de los diferentes productos sintetizados se ha realizado utilizando la técnica de difracción de rayos X de polvo (DRX, Kristalloflex D5000, Siemens, Alemania).



El equipo ha trabajado con radiación  $K\alpha_{1,2}$  de Cu (1,5418 Å) y con un monocromador de grafito. El registro de los difractogramas se ha realizado con un tamaño de paso de  $0,03^\circ$  y un tiempo de adquisición por paso de 5,0 s, en el intervalo angular  $2\theta$  de  $10^\circ$  -  $70^\circ$ , y con una rotación del porta muestras de 15 rpm para minimizar posibles orientaciones de las fases. Las medidas se han realizado sobre muestras en polvo (tamaño de grano menor a 125  $\mu\text{m}$ ).

Los difractogramas se han comparado con los estándar de la base de datos de Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) usando el programa EVA 6.0 Diffrac plus.

Esta técnica se ha usado en todas las etapas del estudio experimental: caracterización de las materias primas (Capítulo 3), caracterización de los productos en el estudio del diagrama de fases  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  -  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  (capítulo 4), caracterización de los polvos sintetizados (Capítulo 5), caracterización de los compactos obtenidos (Capítulo 6), caracterización de las muestras antes y después de los estudios de solubilidad y bioactividad en SBF (Capítulo 7), y caracterización de los materiales sometidos a los estudios celulares (Capítulo 8).

#### **3.1.4. Microscopía óptica y electrónica (MOLR-MEB-EC-EDE)**

El estudio microestructural se ha realizado sobre superficies pulidas de los compactos sinterizados. También se ha analizado la morfología y microestructura de: a) los polvos resultantes de los estudios de solubilidad y b) las superficies de fractura resultantes de la caracterización mecánica de los materiales sinterizados.

Para la caracterización microestructural se han utilizado la técnicas de: microscopía óptica de luz reflejada (MOLR Karl Zeiss, Oberkochen & Jena, Alemania), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB, Hitachi TM1000, Tokio, Japan) y Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (MEB-EC, Hitachi-S4700, Tokio, Japan). La composición química de las fases cristalinas y vítreas se ha determinado utilizando un espectrómetro de dispersión de energías (EDE) acoplado al microscopio electrónico (MEB-EC-EDE, System Noran Six-Thermo Electron Corporation EDS; Waltham, MA).

Las muestras a estudiar se han embutido en una resina epoxi de curado a temperatura ambiente. Posteriormente se han rectificado y desbastado con muelas de diamante y se han pulido con suspensiones diamante con un tamaño de grano de 6, 3 y 1  $\mu\text{m}$ . La

limpieza de las muestras se ha realizado en alcohol etílico con ultrasónidos. Una vez pulidas cuando se consideró necesario se sometieron a un ataque químico suave con ácido acético al 5 % vol durante 1 s. Las muestras se metalizaron con oro, para su estudio por microscopia electrónica de barrido, cuando se consideró necesaria la realización de microanálisis se metalizaron con plata ya que los picos del Au y el P solapan lo que dificulta la cuantificación del fósforo.

Al igual que la DRX, estas técnicas fueron usadas en todas las etapas del estudio experimental.

#### **3.1.5. Análisis Térmico Diferencial y termogravimétrico (ATD-TG)**

El estudio de las transformaciones energéticas experimentadas por las diversas composiciones con la temperatura a una determinada velocidad de calentamiento, se llevó a cabo mediante la técnica de Análisis Térmico Diferencial (ATD) en un instrumento Netzsch STA-490 (Selb, Alemania) a una velocidad de calentamiento de 10°C/min hasta 1500°C (salvo que se considerara la posibilidad de fusión de la muestra a temperaturas inferiores), en flujo de aire seco (20 ml/min), usando crisoles de Pt y polvo de  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como referencia.

Esta técnica fue usada en las siguientes etapas del estudio experimental: caracterización de las materias primas (capítulo 3), Caracterización de los productos en el estudio del diagrama de fases Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> - CaMg(SiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (capítulo 4), caracterización de los polvos sintetizados (Capítulo 5), caracterización de los compactos obtenidos (Capítulo 6).

#### **3.1.6. Microscopía de alta temperatura o de calefacción (MC)**

La microscopía de calefacción se utiliza con el fin de observar las variaciones morfológicas y dimensionales que sufre una muestra de material al ser calentada, pudiéndose determinar los intervalos de temperatura en los que se produce la contracción, expansión y fusión del material en estudio. En este trabajo se ha empleado un microscopio de alta temperatura modelo EM 201 con sistema de análisis de imagen y horno eléctrico, Leica 1750/15 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania).

Se han medido los cambios de geometría visibles durante el calentamiento de muestras prensadas (3-mm de diámetro, 3-mm de altura) situadas sobre una placa de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (> 99,5%) revestida con una lámina de Pt de 0,005 mm de grosor. Se tomaron imágenes en blanco y negro del perfil de la muestra cada 10s desde la temperatura ambiente hasta una temperatura ligeramente superior al punto de fluidez, con una velocidad de calentamiento de  $5^\circ \text{C} / \text{min}$ . El ensayo se realizó en aire. La temperatura fue medida con un termopar PtRh6/PtRh30 en contacto con la placa de la alúmina.

Esta técnica fue usada durante la caracterización de los productos en el estudio del diagrama de fases  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  -  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  (capítulo 4).

### **3.1.7 Dilatometría**

Los ensayos dilatométricos se realizaron en un Dilatómetro Netzch 407/E (Netzch, Alemania). La velocidad de calentamiento fue de  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ . Las muestras se compactaron por prensado uniaxial en forma de cilindros de 8mm y 1 cm de altura con caras plano paralelas. Durante el tratamiento de los datos se restaron las contribuciones del soporte y el palpador, determinadas por una calibración previa.

Esta técnica fue usada durante el estudio de sinterización de compactos (capítulo 6).

### **3.1.8 Espectroscopía Raman**

Se midió la dispersión Raman sobre muestras en polvo con un tamaño menor a  $63\mu\text{m}$  compactado en prensa axial manual. Las medidas se realizaron con un espectrómetro Witec alpha-300R equipado con un microscopio confocal. Se utilizó como excitación un láser de Nd:YAG de longitud de onda de 532 nm, polarizado en la dirección X, enfocado con un haz de  $1\mu\text{m}$  de diámetro, con una potencia incidente en la muestra de 7 MW. La señal de Raman fue detectada mediante un detector CCD multicanal enfriado a  $-60^\circ\text{C}$  por efecto Peltier. La luz fue recogida en una geometría de retrodispersión a través de un objetivo de 20X con una apertura numérica de 0,4. El estudio se realizó entre las frecuencias de  $-20\text{ cm}^{-1}$  a  $1200\text{ cm}^{-1}$ .

### **3.1.9 Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear. RMN**

El estudio estructural de las muestras sintetizadas se realizó utilizando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se obtuvieron los espectros de resonancia

magnética nuclear de alta resolución (RMN-RAM) de  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$  de las muestras en polvo, tamaño menor a  $63\mu\text{m}$ , con un espectrómetro Bruker Avance 400 a un campo magnético de 9,4 Tesla. Esto corresponde a las frecuencias de 79,49 y 161,98 MHz para  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$ , respectivamente. Se usaron velocidades de rotación de la muestra de 10 kHz. Los espectros se registraron mediante secuencias de pulso sencillo. En el caso de  $^{29}\text{Si}$  se realizaron 800 acumulaciones a  $5\mu\text{s}$  (duración del pulso de  $\pi/2$ ) y tiempos de repetición de 10 s. En el caso del  $^{31}\text{P}$  se adquirieron 16 acumulaciones con pulsos de  $5\mu\text{s}$  y tiempos de repetición de 30 s. Los desplazamientos químicos de  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$  se midieron utilizando estándares externos de tetrametilsilano (TMS) y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85 %) respectivamente. Las deconvoluciones de los espectros RMN-RAM se llevaron a cabo mediante el programa WINFIT (Bruker).

Esta técnica fue usada durante la caracterización de los polvos sintetizados (Capítulo 5).

#### 3.1.10 Estudios de propiedades mecánicas

##### 3.1.10.1 Resistencia a la compresión diametral

La resistencia a compresión diametral (RCD), también conocida como el test brasilero, se determinó sobre probetas en forma de discos circulares (15 por cada composición y temperatura) obtenidos mediante sinterización a diversas temperaturas de compactos en verde (10mm de diámetro y 3mm de espesor), cuyas medidas fueron  $8,7\pm 0,3$  mm en diámetro (D) y  $2,6\pm 0,2$  mm de espesor (e), con una relación  $e/D \approx 0,3$ . Los discos fueron colocados entre dos placas de acero inoxidable usando cartones para distribuir las cargas. La carga fue aplicada usando una velocidad de desplazamiento del bastidor de carga de 0,5 mm/min en una máquina universal con una celda de carga de 5kN (Instron 1114, MA EEUU, Instron Corporation, Scanton, MA EEUU). Los datos de carga/desplazamiento fueron obtenidos cada 100ms usando el software SCM 3000 95 versión 14.7.9 (MicroTest, Madrid, ES).

La resistencia,  $\sigma_r$ , de cada probeta fue calculada usando la ecuación {3.1}:

$$\sigma_r = \frac{F}{S} = \frac{2F}{\pi De} \quad \{3.1\}$$

Donde F es la fuerza a la cual ocurre la falla, D y e son el diámetro y el espesor de la probeta respectivamente.

La distribución de los valores de resistencia de materiales frágiles fue descrita por la teoría de Weakest Link, la cual puede ser representada aceptablemente por la función de Weibull.<sup>(1)</sup> Los parámetros de Weibull y sus valores superiores e inferiores a límite de confianza del 90% fueron determinados usando el procedimiento de la norma ENV-843-5<sup>(2)</sup>. En esta norma se propone el uso de la forma más simple de la función de Weibull, ecuación {3.2}, donde  $P_f$  es la probabilidad de falla a un esfuerzo  $\sigma$ ,  $\sigma_0$  es una constante de escalamiento también llamada resistencia característica, que corresponde con el esfuerzo al cual la probabilidad de falla es 63.2 %, y m es el módulo de Weibull.

$$P_f = 1 - \exp \left[ - \left( \frac{\sigma}{\sigma_0} \right)^m \right] \quad \{3.2\}$$

De acuerdo a la norma, las probabilidades de falla fueron calculadas usando la ecuación (6.3):

$$P_f = \frac{n - 0.5}{N} \quad \{3.3\}$$

donde N es el número total de probetas ensayadas y n es el puesto de la probeta en orden ascendente respecto del valor del esfuerzo de falla. Para esta forma simple de la función de Weibull, se toma como cero el esfuerzo para el cual no ocurre la falla en el material, como se sugiere para materiales frágiles. La resistencia característica y el módulo de Weibull fueron estimados para cada material, usando un ajuste lineal por el método de máxima probabilidad de la curva de  $(\ln(1/(1-P_f)))$  contra  $\ln(P_f)$ .

### 3.1.10.2 Módulo de elasticidad

El módulo elástico (Young) de las muestras se ha determinado utilizando el método dinámico para ello se han preparado muestras prismáticas rectangulares (25x2.5x2 mm<sup>3</sup>). Se compactaron mezclas de polvos de forma uniaxial en barras de 70x50x5 mm<sup>3</sup> a una presión de 150 MPa, posteriormente fueron compactados isostáticamente a

200 MPa. Finalmente, los cuerpos sinterizados fueron cortados y pulidos a las dimensiones finales.

El instrumento empleado para este ensayo fue un Grindosonic MK5 “Industrial”, para realizar la medida se coloca la muestra en el portamuestras teniendo en cuenta que la distancia entre los apoyos debe ser de  $0,2 L$ , siendo  $L$  la longitud de la probeta. Mediante un precursor o martillo, se induce la excitación mecánica externa que provoca una vibración cuya señal es amplificada por un micrófono acústico para ser detectada por un piezoeléctrico.

El tratamiento de datos se realizó con ayuda de un programa informático (EMOD), el cual determina el módulo de Young dinámico; introduciendo las características de las muestras (dimensiones y densidad), el valor de la frecuencia de resonancia ( $\mu s$ ) y el coeficiente de Poisson ( $\mu = 0,25$ ).

#### **3.1.10.3 Resistencia a la fractura. Método de flexión en tres puntos.**

La resistencia a la fractura viene determinada por la tensión necesaria para propagar los defectos existentes en los materiales, existe un gran número de ensayos para su determinación siendo los de tracción y flexión los más utilizados. En esta tesis, al tratarse de materiales cerámicos, se han empleado el método de flexión en tres puntos y el de compresión diametral.

Las probetas utilizadas en los experimentos de flexión en tres puntos han sido las mismas que se habían utilizado en la determinación del módulo elástico estático (método no destructivo). Para calcular el módulo de rotura (MOR), se utilizó la siguiente ecuación:

$$\sigma_f = \frac{3}{2} \frac{L \cdot q}{b \cdot a^2} \quad \{3.4\}$$

donde  $\sigma_f$  es el módulo de rotura,  $q$  es la carga a la cual se produce la rotura,  $b$  es la anchura de la probeta y  $a$  el espesor (dimensiones en mm).

La resistencia a la flexión se ha medido usando una máquina universal de ensayos mecánicos ( Instron 4443, España) con un dispositivo de flexión en 3 puntos con una

distancia entre apoyos de 20 mm y una velocidad de desplazamiento de 0,5 mm por minuto.

### 3.1.11 Experimentos de bioactividad

#### 3.1.11.1 Estudio de solubilidad en Tris-HCl

Con el objetivo de estimar la solubilidad y la biodegradabilidad de los materiales estudiados, se realizaron estudios *in vitro* usando muestras en forma de polvo en una solución tampón de Tris-HCl propuesta por distintos investigadores<sup>(3,4,5)</sup>. La solución fue preparada disolviendo 50 mmoles de tris(hidroximetil)aminometano,  $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ , en 1L de agua destilada, adicionando antes de aforar el HCl (1M) necesario para obtener un pH 7,4.

Para cada experimento se utilizaron  $15 \pm 1$  mg de polvo, el cual fue colocado en tubos de polietileno de 100 mL con fondo cónico, a los que se adicionó solución Tris-HCl a  $36,5 \pm 0,5$  °C y  $\text{pH} = 7,40 \pm 0,02$ , de manera que se tuviera una relación de 1 g de polvo/L. Los tubos fueron sometidos a sacudidas suaves durante todo el experimento en una cámara a 36,5°C. Después de 1, 2, 4 y 8 semanas de tratamiento, se separó la solución por decantación y el polvo fue sometido a varios lavados con agua desionizada y secados en la misma cámara a 36,5°C.

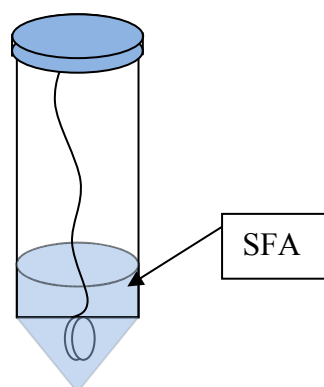
La concentración de iones de Ca, Mg, P y Si en la solución removida se determinó mediante espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo. El pH del Tris-HCl se determinó utilizando un pH-metro usando como electrodo de referencia Ag/AgCl. Las muestras, antes y después de la exposición a la solución, fueron examinadas por MEB-EC.

#### 3.1.11.2 Estudio *in vitro* en SFA

Con el objetivo de estimar la bioactividad de los materiales desarrollados en una disolución con una composición similar a la del suero fisiológico, se realizaron estudios *in vitro* usando el suero fisiológico artificial (SFA). El SFA bufferizado No. 9 ( $\text{Na}^+$  142.0,  $\text{K}^+$  5.0,  $\text{Mg}^{2+}$  1.5,  $\text{Ca}^{2+}$  2.5,  $\text{Cl}^-$  147.8,  $\text{HCO}_3^-$  4.2,  $\text{HPO}_4^{2-}$  1.0 y  $\text{SO}_4^{2-}$  0.5 mol/m<sup>3</sup>) con concentraciones iónicas muy cercanas a la del plasma sanguíneo humano fue preparado siguiendo las indicaciones de la norma ISO 23317 la cual está basada en lo propuesto por Kokubo y Takadama.<sup>(6)</sup>

Las muestras se sinterizaron en forma de barras y se cortaron en forma de discos de  $6\pm 1$  mm de diámetro y  $2\pm 0,2$  mm de espesor. Los discos se colocaron en tubos de polietileno de 100 mL con fondo cónico, como se muestra en la Figura 3.1, de manera que la muestra estuviera bañada completamente por la solución. Se adicionó la cantidad de SFA necesaria, a  $36,5\pm 0,5$  °C y pH=7,40, para que la relación volumen SFA/área cerámico fuera igual a  $0.1 \text{ cm}^3/\text{mm}^2$ . EL SFA fue preparado usando botellas y frascos, que fueron pre-lavados con un detergente neutro y agua desionizada. Los discos fueron sacados del SFA a 3, 7, 14 y 21 días de tratamiento, se lavaron generosamente con agua desionizada y se secaron en aire a temperatura ambiente.

La concentración de iones de Ca, Mg, P y Si en el SFA después de cada experimento se determinó mediante espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES, Jarrel Ash Iris Advantage, U.S.A.). El pH del SFA fue determinado por medio de un pH-metro utilizando un electrodo de referencia de Ag/AgCl.



**Figura 3.1** Montaje de laboratorio para el estudio de la bioactividad en SFA.

La evolución de la morfología de la superficie y de las secciones transversales de los materiales fue analizada mediante MEB de la sección transversal.

#### **3.1.12 Ensayos de biocompatibilidad *in vitro* en cultivos celulares**

En el estudio se han utilizado osteoblastos fetales humanos, subcultivo 4 (HOb; Health Protection Agency Culture Collections -HPAC- 406-05f). Este cultivo primario se ha escogido teniendo en cuenta las aplicaciones esperadas de los materiales de estudio. Las células se han obtenido cumpliendo las normas del comité ético del Hospital General de Ávila.



La siembra de las células, la incubación y el tratamiento de las probetas se realizó siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

Los medios de cultivo y reactivos utilizados en los experimentos con cultivos celulares han sido.

- Medio de cultivo DMEM/F12 HAM con HEPES (SIGMA D8437), suplementado con penicilina/estrepomicina (SIGMA P0781) y suero fetal bovino (GIBCO 10270-106).
- Medio de cultivo DMEM/F12 HAM con HEPES y sin rojo fenol (SIGMA D6434), suplementado con penicilina/estrepomicina, L-glutamina (SIGMA G7513) y suero fetal bovino.
- Solución salina de Dulbecco tamponada con fosfato (PBS, SIGMA D8537).
- Disolución de tripsina (0,5 g/l) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA; 0,2 g/l) en una solución salina balanceada de Hank (Tripsina-EDTA; SIGMA).
- Discos de 13 mm diámetro TMX (Thermanox®, NUNC)
- Triton X-100 (MERCK)
- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (reactivo MTT; SIGMA).
- Dimetil sulfoxido (DMSO; SHARLAU)
- Reactivo *Alamar Blue*<sup>™</sup> (AB, SEROTEC).
- Disolución al 2,5% de glutaraldehído (FLUKA) en tampón sodio cacodilato 0,1 M (SIGMA)

### **3.1.12.1 Protocolo del ensayo MTT**

El ensayo MTT se ha utilizado para determinar la posible aparición de toxicidad, en el medio de cultivo que se ha mantenido en contacto con los materiales, derivada de la liberación de algún tipo de componente citotóxico (producto de su degradación, iones o partículas sólidas liberadas, etc.)<sup>(7)</sup>. El reactivo utilizado es el MTT [bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (SIGMA).

El protocolo del ensayo es el siguiente:

- Obtención de los eluyentes o lixiviados del material en medio de cultivo completo sin suero a 1, 3 y 8 días, tras mantener muestras de 13 mm de diámetro a 37 °C y en agitación durante estos tiempos. Se han empleado 5 ml de medio por cada muestra.

- Siembra de células (osteoblastos humanos, pase 4), se ha usado medio de cultivo completo fresco, a una concentración de  $10^5$  células/ml, sobre placas de 96 pocillos (100  $\mu$ l de concentrado de células/pocillo).
- Incubación 24 h a 37 °C y una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>.
- Intercambio del medio de cultivo por los lixiviados de los materiales, previamente recogidos a 1, 3 y 8 días (n=12).
- Incubación 24 h a 37 °C y una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub>.
- Retiro del contenido de los pocillos, añadiendo en su lugar el reactivo MTT.
- Incubación 4 h a 37 °C y una atmósfera con un 5% de CO<sub>2</sub>.
- Retiro del contenido de los pocillos, añadiendo 100  $\mu$ l de DMSO/pocillo.
- Lectura, con agitación de 20 s a elevada intensidad, de densidad óptica a 570 nm, con una longitud de onda de referencia de 630 nm.
- A los valores de absorbancia obtenidos se les restan los valores medidos para el blanco, y se relativizan con respecto a los valores leídos para el control negativo TMX, obteniendo la viabilidad celular relativa (%VR) con respecto a este control, a partir de la siguiente fórmula:

$$\%VR = \frac{DO_S - DO_B}{DO_C - DO_B} \times 100 \quad \{3.5\}$$

donde, DO<sub>S</sub>, DO<sub>B</sub> y DO<sub>C</sub> son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (medio de cultivo introducido en pocillos sin células) y el control, respectivamente.

### 3.1.12.2 Protocolo del ensayo *Alamar blue*<sup>TM</sup>.

El ensayo **Alamar Blue** se realizó con el objetivo de estudiar la evolución temporal de la proliferación celular, durante un periodo de 21 días, en cultivos establecidos directamente sobre la superficie de los materiales. Este ensayo permite realizar diferentes medidas de actividad celular a lo largo de un periodo debido a que el reactivo utilizado no resulta tóxico para las células cultivadas en contacto con el mismo. La actividad celular tiene como resultado la reducción del reactivo adicionado que vira de color, hecho que puede medirse colorimétricamente<sup>(8)</sup>.

El protocolo del ensayo de Alamar Blue es el siguiente:

- Siembra de células, a una concentración de  $10^5$  células/ml en medio de cultivo completo fresco, sobre muestras de TMX y las muestras problema introducidas en una placa de 96 pocillos ( $n=6$ ; 100  $\mu$ l de concentrado de células/pocillo).
- Después de incubar esta placa durante 24 h a 37 °C en una atmósfera con un 5% de  $\text{CO}_2$  se ha retirado el medio de cultivo, se han lavado las muestras con PBS, añadiendo en su lugar una disolución al 10% del reactivo *Alamar Blue* en medio completo libre de rojo fenol (150  $\mu$ l/pocillo), que se ha mantenido en contacto con los cultivos durante 4 h a 37 °C en una atmósfera con un 5% de  $\text{CO}_2$ . Transcurrido este tiempo, se han trasvasado 100  $\mu$ l del contenido de los pocillos a otra placa de 96 pocillos, reponiendo medio completo fresco en las placas inicialmente sembradas (100  $\mu$ l/pocillo). Por último, se ha realizado una lectura de densidad óptica en un espectrofotómetro Biotek ELX808IU a 570 nm, con una longitud de onda de referencia de 630 nm, de las muestras, restando los valores de absorbancia medidos para el blanco a los valores obtenidos para las distintas muestras.
- El protocolo anteriormente descrito se ha repetido a 3, 8, 15 y 21 días, lo que ha permitido obtener el patrón que modeliza la proliferación de osteoblastos sobre la superficie de TMX y las formulaciones experimentales durante los 21 días que ha durado el ensayo.

### **3.1.12.3 Protocolo del ensayo de morfología y proliferación celular bajo microscopía electrónica de barrido (MEB)**

El presente ensayo pretende determinar la morfología y la proliferación celular en cultivos establecidos directamente sobre la superficie de los materiales, durante un periodo de 72 horas, mediante observación directa usando microscopía electrónica de barrido.

- Siembra de células ( $n=2$ ) en medio de cultivo completo fresco ( $10^5$  células/ml) sobre las muestras introducidas en placas de 24 pocillos (1 ml de concentrado de células/pocillo).
- Incubación 8 h a 37 °C en una atmósfera con un 5% de  $\text{CO}_2$ .
- Cambio del medio de cultivo por medio de cultivo fresco.
- Incubación hasta alcanzar las 24 y 72 h totales de cultivo a 37 °C en una atmósfera con un 5% de  $\text{CO}_2$ .

- Extracción del medio de cultivo, adicionando en su lugar 1 ml por pocillo de una disolución al 2,5% de glutaraldehído (Fluka) en tampón sodio cacodilato 0,1 M (Sigma).
- 4 h a temperatura ambiente en oscuridad (posteriormente las muestras se han conservado en oscuridad a 4 °C).
- 2 lavados con agua destilada estéril y secado de las muestras a 37 °C.
- Metalizado y observación bajo microscopio electrónico de barrido (Hitachi TM-1000).

### 3.2 Materias primas utilizadas en el desarrollo del proyecto

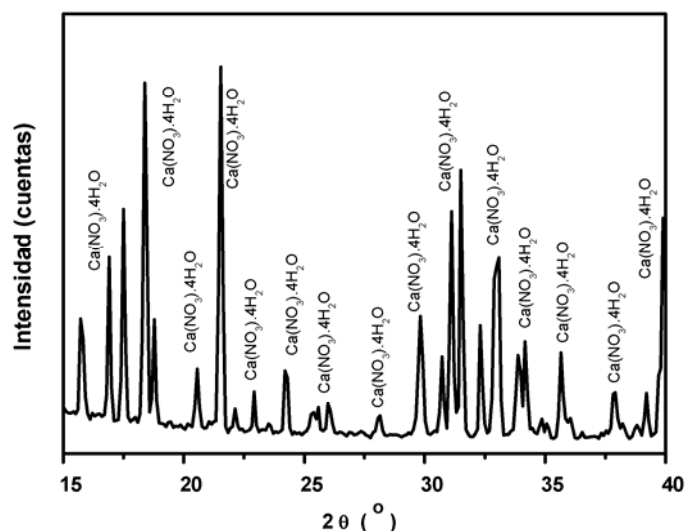
Con el objetivo de obtener los materiales diseñados se han usado materias primas comerciales y sintéticas. En este apartado se presenta su caracterización, principalmente desde un punto de vista químico, granulométrico y mineralógico, ya que la pureza en los materiales para aplicaciones biomédicas es un factor crítico, sabiendo que la presencia de altos contenidos de impurezas puede resultar en una respuesta celular indeseable. Mientras que las características morfológicas de las materias primas permiten establecer un adecuado proceso de sinterización.

La caracterización de los materiales de partida se ha realizado mediante la determinación de las fases cristalinas presentes en los polvos por DRX, la densidad, la distribución de tamaño de partícula y la determinación de la superficie específica mediante BET. El análisis químico de la sílice, única materia prima de la cual no se suministra esta información por la casa comercial, se realizó mediante espectroscopía por fluorescencia de rayos X. En las materias primas que pudieran presentar incertidumbre en el grado exacto de hidratación una vez en contacto con el ambiente del laboratorio, se realizó un análisis ATD-TG en el momento de su uso.

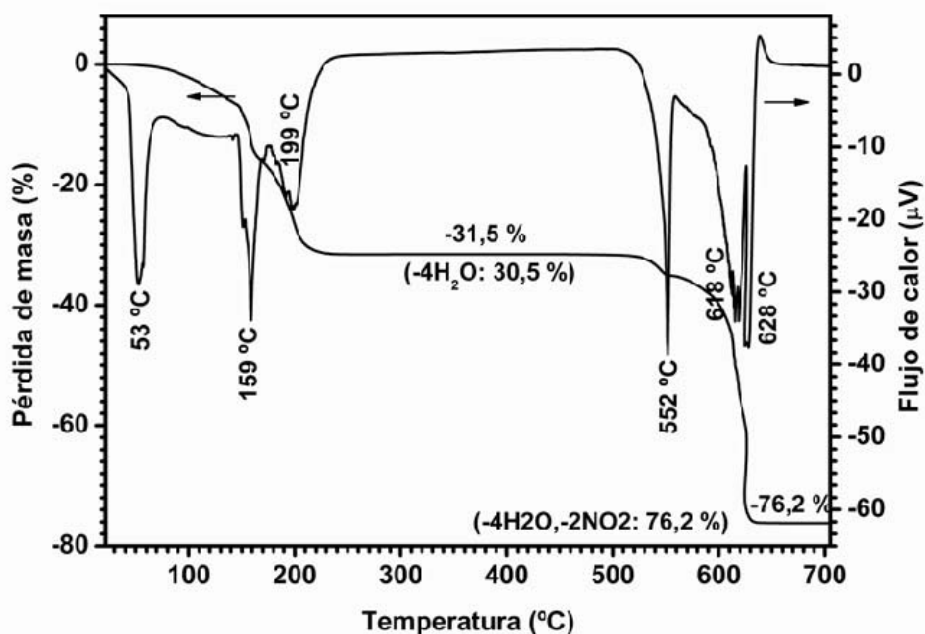
#### 3.2.1 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Como fuente de calcio en la etapa de síntesis de fosfatos de calcio apatíticos mediante el método de solución-precipitación se utilizó  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  de pureza analítica (> 99.0% en peso, Panreac, Barcelona, España). En la Figura 3.2 se muestra su difractograma y en él se puede observar que todos los picos de difracción observados corresponden con  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (PDF 26-1406). En la Tabla 3.1 se presenta el análisis químico registrado por la casa comercial y las características físicas.

En la Figura 3.3 se muestra el ATD-TG correspondiente al  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  una vez abierto el bote. El  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  se deshidrata totalmente sin descomponer por encima de  $200\text{ }^\circ\text{C}^{(9)}$ , por lo que para estimar su pureza se puede emplear la pérdida correspondiente a esta deshidratación.



**Figura 3.2.** Difractograma de Rayos X correspondiente al  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  de partida (PDF 73-0988,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ).

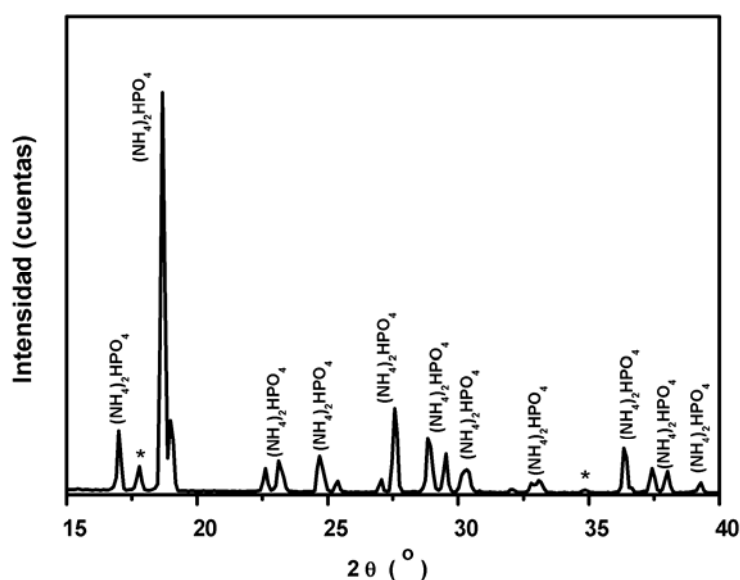


**Figura 3.3.** ATD-TG correspondiente al  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  de partida.

### 3.2.2 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

Como fuente de fosfato en la etapa de síntesis de fosfatos de calcio apatíticos mediante el método de solución-precipitación se utilizó  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  de pureza analítica ( $> 98.0\%$  en peso, Panreac, Barcelona, España). En la Tabla 3.1 se presenta el análisis químico registrado por la casa comercial y las características físicas.

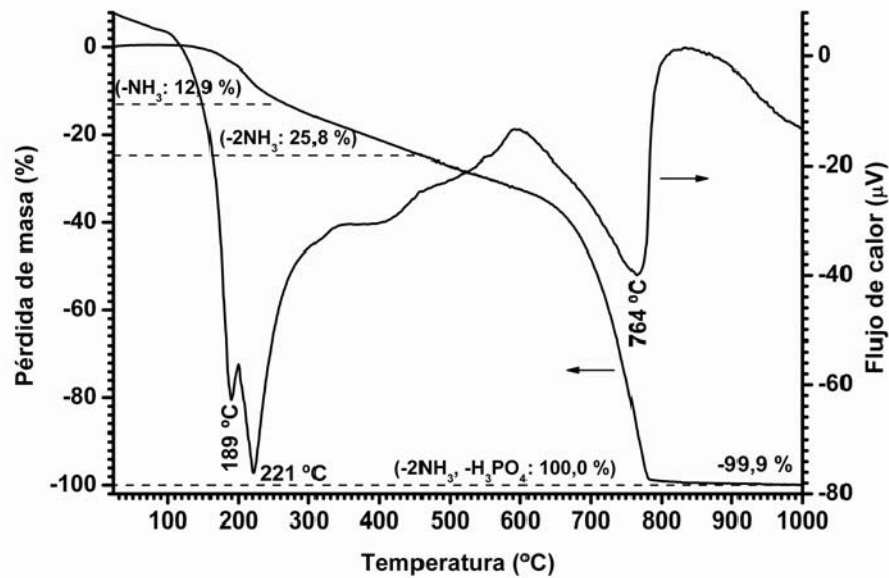
El difractograma de Rayos X que se muestra en la Figura 3.4 indica que el producto está compuesto fundamentalmente por  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (PDF 29-0111), aunque se observan pequeños picos correspondiente a  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (PDF 37-1479).



**Figura 3.4.** Difractograma de Rayos X del  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  de partida.  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (PDF 29-0111), \* corresponde a  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (PDF 37-1479).

El ATD-TG del reactivo, Figura 3.5, muestra el comportamiento térmico de descomposición típico del  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  y revela que el contenido de materia no volátil es inferior al 0,1 %.

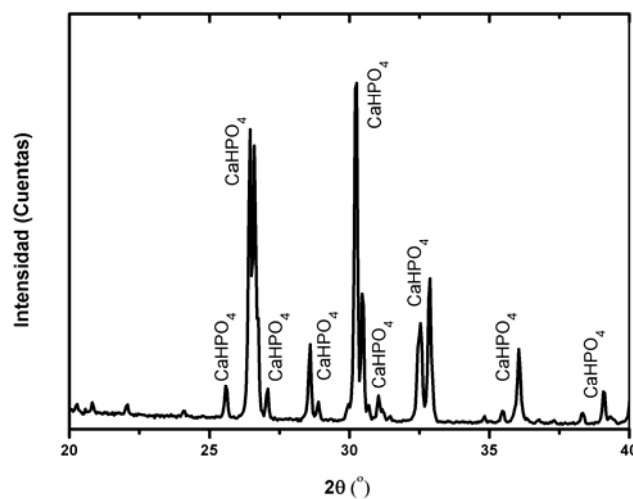
Teniendo en cuenta que el producto contiene  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , se decidió medir el contenido de ortofosfato mediante el empleo el método potenciométrico. El contenido de ortofosfato medido fue de  $77 \pm 1\%$ .



**Figura 3.5.** ATD-TG del  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  de partida.

### 3.2.3 $\text{CaHPO}_4$ .

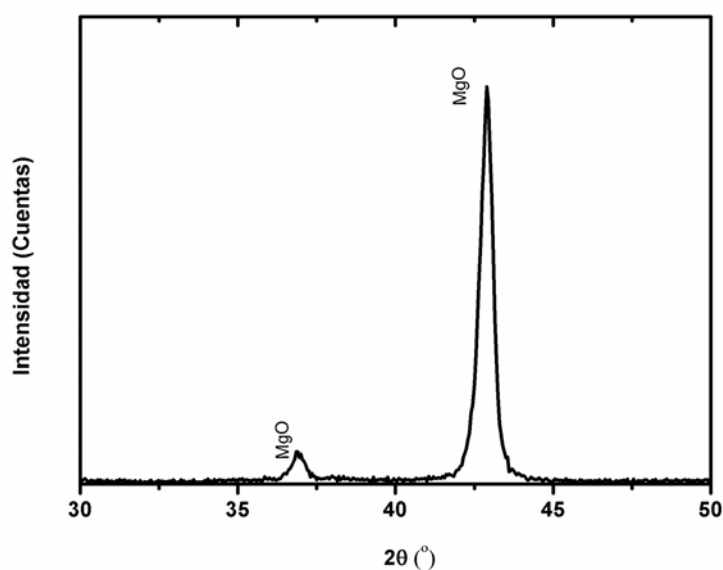
Como fuente de  $\text{PO}_4^{3-}$  en la síntesis de fosfato tricálcico por reacción en estado sólido se empleó fosfato dicálcico anhidro, DCPA ( $\text{CaHPO}_4$ ) de pureza analítica (> 99.0% en peso, Panreac, Barcelona, España). En la Figura 3.6 se muestra su difractograma y en él se puede observar que todos los picos de difracción observados corresponden con la monetita ( $\text{CaHPO}_4$ ). En la Tabla 3.1 se presenta el análisis químico registrado por la casa comercial y las características físicas.



**Figura 3.6** Difractograma de rayos X del  $\text{CaHPO}_4$ . (PDF 09-0088)

### 3.2.7 MgO

Como fuente de magnesio en la síntesis de dióxido y de fosfatos tricálcicos dopados se empleó óxido de magnesio (MgO) de pureza analítica (> 97% en peso, Panreac, Barcelona, España). En la Figura 3.7 se muestra su difractograma y en él se puede observar que todos los picos de difracción corresponden con la fase mineral periclase. En la Tabla 3.1 se presenta el análisis químico suministrado por la casa comercial y las características físicas



**Figura 3.7.** Difractograma de rayos X del MgO. ( PDF 45-0946)

### 3.2.8 CaCO<sub>3</sub>

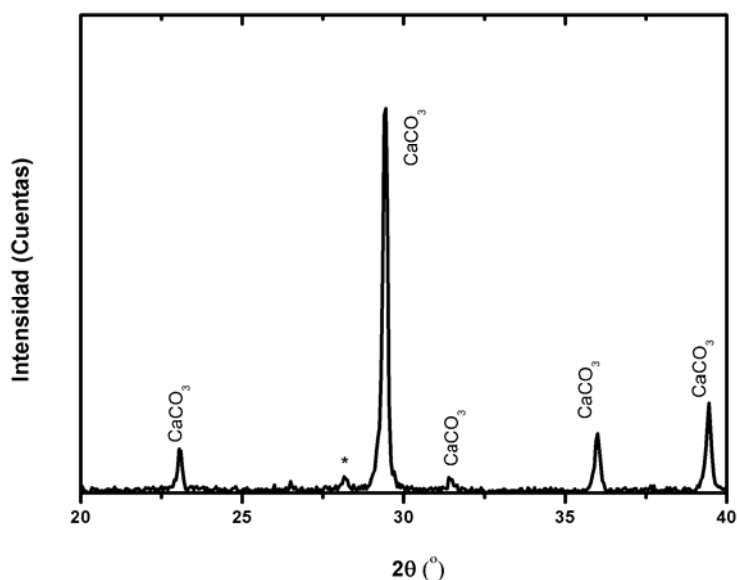
Como fuente de calcio en la síntesis de dióxido y de fosfatos tricálcicos dopados se empleó carbonato de calcio (CaCO<sub>3</sub>) de pureza analítica (> 99% en peso, Panreac, Barcelona, España). En la Figura 3.8 se muestra su difractograma y en él se puede observar que es una calcita aunque se observan indicios de CaSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O. En la Tabla 3.1 se presenta el análisis químico suministrado por el fabricante y las características físicas.

### 3.2.9 SiO<sub>2</sub>

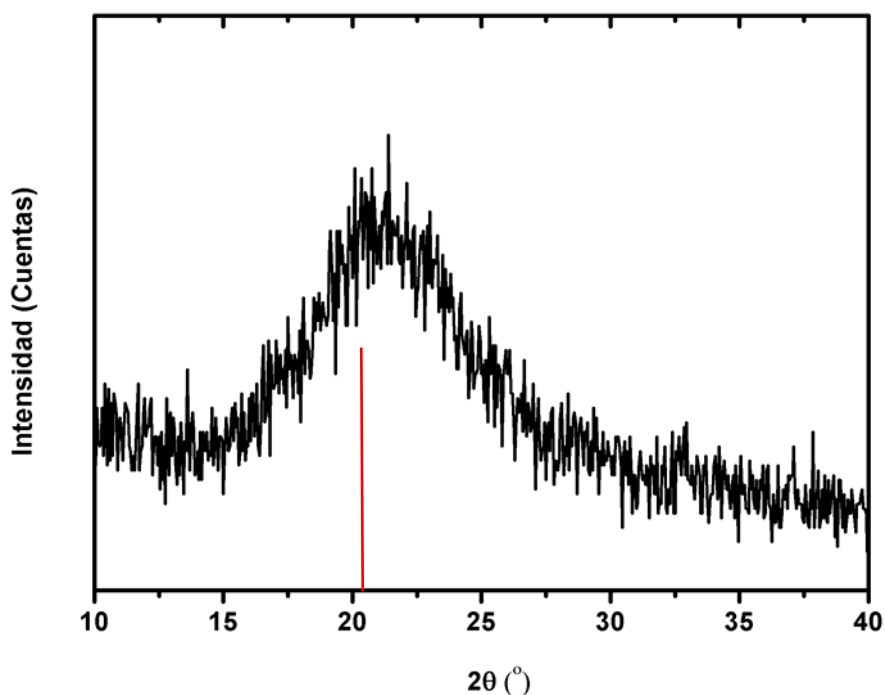
Como fuente de silicio en la síntesis de dióxido y de fosfatos tricálcicos dopados se empleó se empleó una sílice de alta pureza, >99,8%, de la casa ABCR (S93-1435). En la Tabla 3.2 se muestra el análisis químico realizado por FRX, se confirma su alta



pureza (99,8 %), y que la mayor impureza  $\text{Al}_2\text{O}_3$  se encuentra dentro de límites aceptables (0,11 % en peso). En la Figura 3.9 se muestra el difractograma de DRX de la sílice empleada, en el que se observa un pico muy ancho y de baja intensidad (centrado en  $2\theta$ :  $\sim 22^\circ$ , posición del pico de mayor intensidad de la cristobalita) característico de los materiales amorfos.



**Figura 3.8.** Difractograma de rayos X del  $\text{CaCO}_3$ . (PDF 72-1937). \* Pico asociado a  $\text{CaSO}_3 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$  (PDF 39-0725)



**Figura 3.9.** Difractograma de rayos X de la sílice. (PDF 83-1339).

**Tabla 3.1.** Análisis químico de materias primas comerciales suministrado por el fabricante y propiedades físicas determinadas experimentalmente.

Materia Prima	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	MgO	$\text{CaCO}_3$	$\text{CaHPO}_4$
Pureza (%)	>99	>98	>97	>99,0	>99,0
Insol. En HCl (%)				0,005	<0,025
Pérdida por calcinación (%)			<2		
Carbonato como $\text{CO}_2$ (%)			<1,5		
Cloruro ( $\text{Cl}^-$ ) (%)	<0,005	<0,0005	<0,01	<0,001	<0,0051
Fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) (%)				0,005	
Fluoruro ( $\text{F}^-$ ) (%)					<0,005
Sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) (%)	<0,002	<0,004	<0,001	<0,01	<0,05
Amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (%)	<0,005			0,03	
As (%)		<0,0001			<0,0002
Ba (%)	<0,05		<0,001	<0,01	<0,01
Ca (%)		<0,001	<0,02		
Cd (%)	<0,005		<0,0005		
Co (%)	<0,005		<0,0005		
Cr (%)	<0,005		<0,0005		
Cu (%)	<0,005	<0,001	<0,0005	<0,0005	<0,001
Fe (%)	<0,005	<0,001	<0,005	<0,002	<0,005
K (%)	<0,05	<0,005	<0,005	<0,02	
Mg (%)	<0,1	<0,0005		<0,03	<0,2
Mn (%)	<0,005	<0,005	<0,0005	<0,0005	
Na (%)	<0,05		<0,2	<0,05	
Ni (%)	<0,005	<0,001	<0,0005	<0,0005	<0,001
Pb (%)	<0,005	<0,001	<0,0005	<0,0005	<0,001
Sr (%)			<0,002		
Zn (%)	<0,005		<0,0005	<0,05	
Dens. (g/cc)	n.d.	n.d.	3,19	2,67	2,92
Ss ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	n.d.	n.d.	29,5	0,03	2,2
d50 ( $\mu\text{m}$ )	n.d.	n.d.	7,3	30,7	6,02
d90 ( $\mu\text{m}$ )	n.d.	n.d.	14,5	46,8	45,9

**Tabla 3.2.** Análisis químico por fluorescencia de rayos X de la sílice utilizada como materia prima. Entre paréntesis se incluye el error experimental.

	<b>SiO<sub>2</sub></b>
CaO	0,015 (2)
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,028 (4)
K <sub>2</sub> O	0,015 (3)
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,005 (1)
SiO <sub>2</sub>	99,8 (2)
SO <sub>3</sub>	0,003 (1)
TiO <sub>2</sub>	0,016 (2)
Na <sub>2</sub> O	0,015 (2)
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,11 (3)
ZrO <sub>2</sub>	0,006 (1)
Dens. (g/cm <sup>3</sup> )	2,223
Ss (m <sup>2</sup> /g)	0,04
d <sub>50</sub> (μm)	120,5
d <sub>90</sub> (μm)	227,8

## Referencias

---

- <sup>1</sup> W. Weibull. "A statistical distribution function of wide applicability". *J Appl Mech*;18:292–297 (1951).
- <sup>2</sup> ENV 843-5:2006. Advanced technical ceramics. Mechanical properties of monolithic ceramics at room temperature. Statistical analysis.— Part 5: Statistical analysis.
- <sup>3</sup> W. Xue, K. Dahlquist, Banerjee A, Bandyopadhyay A, Bose S. "Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants". *J Mater Sci: Mater Med* 19:2669–2677(2008)
- <sup>4</sup> S. Ni, K. Lin, J. Chang, L. Chou. " $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub>/ $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> composite materials for hard tissue repair: In vitro studies". *Journal of biomedical materials research. Part A* [1549-3296] 85 [1] 72-82 (2008)
- <sup>5</sup> P. Ducheyne, S. Radin, L. King. "The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on *in vitro* behavior. I. Dissolution". *Journal of Biomedical Materials Research*. 27 [1] 25-34 (1993)
- <sup>6</sup> T. Kokubo, H. Takadama. "How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?". *Biomaterials* 27 2907–2915 (2006)
- <sup>7</sup> Q.X. Niu, C.Y. Zhao, Z.A. Jing. "An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity". *J Immunol Methods* 251 11-19 (2001).
- <sup>8</sup> G.R. Nakayama, M.C. Caton, M.P. Nova, Z. Parandoosh. "Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*". *J Immunol Methods* 204 205-208 (1997).
- <sup>9</sup> J. Paulik, F. Paulik, M. Arnold. Thermogravimetric examination of the dehydration of calcium nitrate tetrahydrate under quasi-isothermal and quasi-isobaric conditions. *J. Therm. Anal.*; 27 409 (1983).

**Capítulo 4.**

**DIAGRAMA DE FASES**

**FOSFATO TRICALCICO  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$**

**– DIOPSIDO  $[\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2]$**



El conocimiento de los diagramas de equilibrio de fases es de gran importancia en el estudio y diseño de materiales con propiedades optimizadas en función de su composición mineralógica y microestructural, en especial, si como en el caso de la mayoría de los materiales cerámicos son complejos en composición y poseen microestructuras multifásicas.

Es por esto, que antes de abordar el diseño de biocerámicas de  $C_3P$  con Mg y Si en su composición, es necesario un conocimiento exacto de las relaciones de fases en el sistema  $C_3P$ -CMS<sub>2</sub> para obtener materiales con propiedades químicas, mecánicas y biológicas controladas.

#### **4.1 Revisión Bibliográfica.**

La única publicación encontrada en la bibliografía del diagrama de equilibrio de fases  $C_3P$ -CMS<sub>2</sub> corresponde a T. Sata y data de 1959 (Figura 4.1)<sup>(1)</sup>. Según este autor, el sistema presenta un punto eutéctico al 39 % en peso de  $C_3P$  con una temperatura de  $1311 \pm 4$  ° C. De los datos de este trabajo se deduce que existe un amplio rango de solución sólida entre el CMS<sub>2</sub> y el  $C_3P$  con el límite de solubilidad  $\approx 20\%$  en peso de CMS<sub>2</sub>. La temperatura de la transición  $\beta$ - a  $\alpha$ -  $C_3P$  aumenta con el contenido de CMS<sub>2</sub> en solución sólida en el  $C_3P$  hasta alcanzar  $1450$ - $1520$  ° C para el 20 % en peso de CMS<sub>2</sub>. No aporta ninguna precisión sobre la dependencia de la transformación  $\beta \rightarrow \alpha$  en el  $C_3P$  con la temperatura y la composición, ni sobre el límite de solubilidad del CMS<sub>2</sub> en  $C_3P$  con la temperatura.

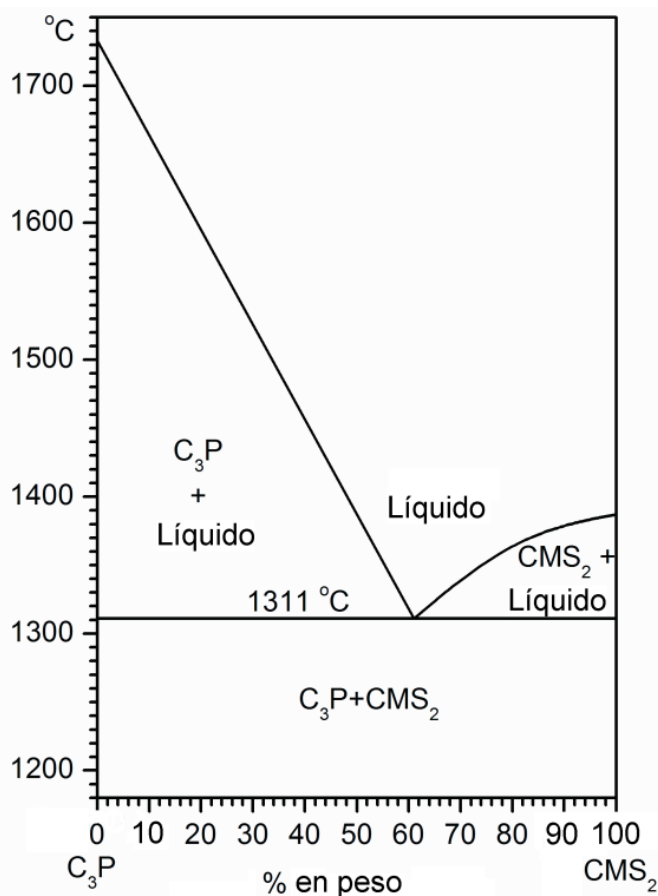
De lo anteriormente enunciado se deduce la falta de información concluyente referente al sistema  $CaMg(SiO_3)_2$ - $Ca_3(PO_4)_2$ ; así pues con la finalidad de completar, confirmar o modificar los datos disponibles se consideró necesario estudiar experimentalmente el diagrama de equilibrio  $C_3P$ -CMS<sub>2</sub>.

#### **4.2 Procedimiento Experimental**

##### **4.2.1 Síntesis de $C_3P$**

El  $C_3P$  se preparó por el método de solución-precipitación en medio acuoso mediante adición de una solución de nitrato de calcio  $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ; (Panreac) en un reactor que contenía una solución de fosfato de diamonio  $(NH_4)_2HPO_4$  (Panreac), el producto obtenido se calcinó a  $800^\circ C$ , tal como se expondrá con detalle en el capítulo 5 sobre la

síntesis de fosfato tricálcico (ver apartado 5.2). Los detalles de las técnicas experimentales se presentan en el capítulo 3. El resultado del análisis químico del  $C_3P$  obtenido se presenta en la Tabla 4.1.



**Figura 4.1.** Diagrama de equilibrio de fases del sistema  $C_3P$ - $CMS_2$  (dibujado utilizando los datos publicados por Sata<sup>(1)</sup>).  $C_3P = Ca_3(PO_4)_2$ ;  $CMS_2 = CaMg(SiO_3)_2$

#### 4.2.2 Síntesis de $CMS_2$

El  $CMS_2$  fue sintetizado por reacción en estado sólido utilizando como materias primas  $CaCO_3$  (> 99% en peso, Panreac, Barcelona, España), Sílice amorfa (> 99,8 % en peso, Strem Chemicals Inc., Newburyport, MA), y  $MgO$  (> 99,6 % en peso, Fluka, Darmstadt, Germany). El  $MgO$  fue previamente calcinado a 950  $^{\circ}C$  para remover el agua adsorbida y otros volátiles. Las materias primas fueron mezcladas en la relación molar apropiada ( $CaCO_3:MgO:SiO_2 = 1:1:2$ ) molidos hasta 3-4  $\mu m$  en molino de atrición con alcohol isopropílico y bolas de Y-TZP ( $\varnothing 2mm$ ). El polvo obtenido se secó a 60 $^{\circ}C$  durante una noche y se calentó en un horno eléctrico hasta 950 $^{\circ}C$  durante 4h para descomponer el  $CaCO_3$ . La mezcla de óxidos resultante fue remolida en un mortero de ágata y sometida a prensado isostático a 150 MPa y calcinada en un crisol



de platino durante 6h a 1300°C. Los compactos obtenidos se molieron hasta un tamaño medio de partícula de 3,0  $\mu m$  en un molino con discos de carburo de tungsteno. El análisis por DRX del polvo confirmó el carácter monofásico del CMS<sub>2</sub> (PDF 86-0932) y su composición química es presentada en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1.** Resultado del análisis químico por FRX de los polvos sintetizados de C<sub>3</sub>P y CMS<sub>2</sub>.

<b>Análisis químico (% en peso)</b>	<b>CMS<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>3</sub>P</b>
CaO	25,8±0,3	54,6±0,03
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	n.d.	45,4±0,03
SiO <sub>2</sub>	55,3±0,3	n.d.
MgO	18,5±0,3	n.d.
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,019±0,004	n.d.
Na <sub>2</sub> O	0,061±0,006	n.d.
K <sub>2</sub> O	0,013±0,004	n.d.
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,045±0,002	n.d.
CaO:MgO:SiO <sub>2</sub> relación molar	1,00:1,00:2,01	-
CaO:P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> relación molar	-	3,04
Análisis mineralógico	Diópsido	$\beta$ -C <sub>3</sub> P

#### **4.2.3 Estudios de las fases en equilibrio.**

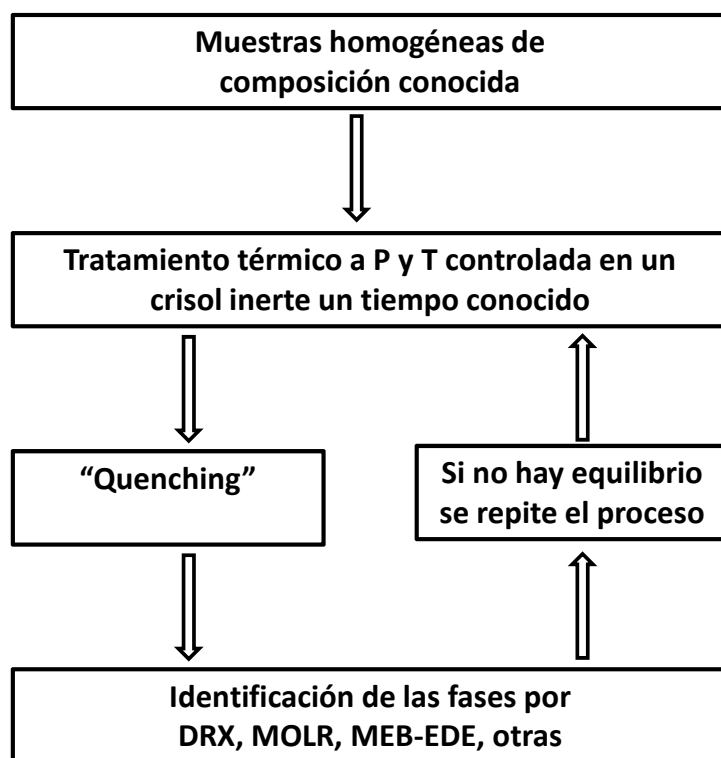
La selección de las composiciones a estudiar se realizó teniendo en cuenta la información suministrada por la bibliografía sobre el diagrama binario CaMg(SiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> - Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. En la Tabla 4.2 se enumeran las composiciones seleccionadas y preparadas para el estudio del sistema.

**Tabla 4.2.** Composiciones del sistema C<sub>3</sub>P-CMS<sub>2</sub> seleccionadas para el estudio del equilibrio de fases.

Composición		C0	C40	C45	C80	C90	C95	C99	C100
%	C <sub>3</sub> P	0	40	45	80	90	95	99	100
	CMS <sub>2</sub>	100	60	55	20	10	5	1	0

Se prepararon lotes de cada composición de  $\approx 10$  g. Los polvos de  $C_3P$  y  $CMS_2$  fueron previamente secados a  $110^\circ C$  durante una noche. Las cantidades requeridas de cada componente fueron pesadas en una balanza analítica y homogenizadas 3 veces con acetona en un mortero de ágata y colocadas en una estufa a  $60^\circ C$ . El producto fue disgregado en un mortero de ágata y prensado isostáticamente a 200 MPa en forma de pequeñas pastillas de  $\sim 8$  mm de altura y  $\sim 8$  mm de diámetro. Los compactos así obtenidos se introdujeron en crisoles de platino. Las muestras colocadas en el interior de estos crisoles se han situado, para evitar gradientes térmicos, en la zona de homogeneidad de temperatura de un horno eléctrico vertical junto a la punta de un termopar de referencia, del cual quedan suspendidas mediante un hilo de platino / platino-rodio 10%.

Los compactos de las ocho composiciones estudiadas (Tabla 4.2) se trataron a diferentes temperaturas desde  $1100^\circ$  hasta  $1500^\circ C$  durante tiempos variables entre 4 y 9 h hasta lograr el equilibrio, el cual se congeló mediante enfriamiento rápido “quenching” desde la temperatura de tratamiento térmico hasta temperatura ambiente, siguiendo el procedimiento mostrado en la Figura 4.2. En algunas de estas composiciones se hizo necesario moler, prensar y volver a tratar térmicamente la muestra para alcanzar el equilibrio.



**Figura 4.2.** Procedimiento experimental seguido en la identificación de fases en equilibrio.

#### **4.2.4 Caracterización de los productos**

A las muestras en equilibrio se les realizó análisis microestructural sobre muestra pulida mediante MOLR y MEB, la composición química de cada fase, cristalina o vítrea, se determinó mediante un sistema que dispone de un espectrómetro de dispersión de energía de rayos X (EDE) acoplado al MEB, la composición de las fases se estableció mediante DRX usando los patrones PDF 09-0169, 09-0348, y 86-0932, para  $\beta$ - $C_3P$ ,  $\alpha$ - $C_3P$ , y  $CMS_2$ . Los detalles de las técnicas se presentan en el capítulo 3.

### **4.3 Resultados experimentales**

#### **4.3.1. Análisis mineralógico**

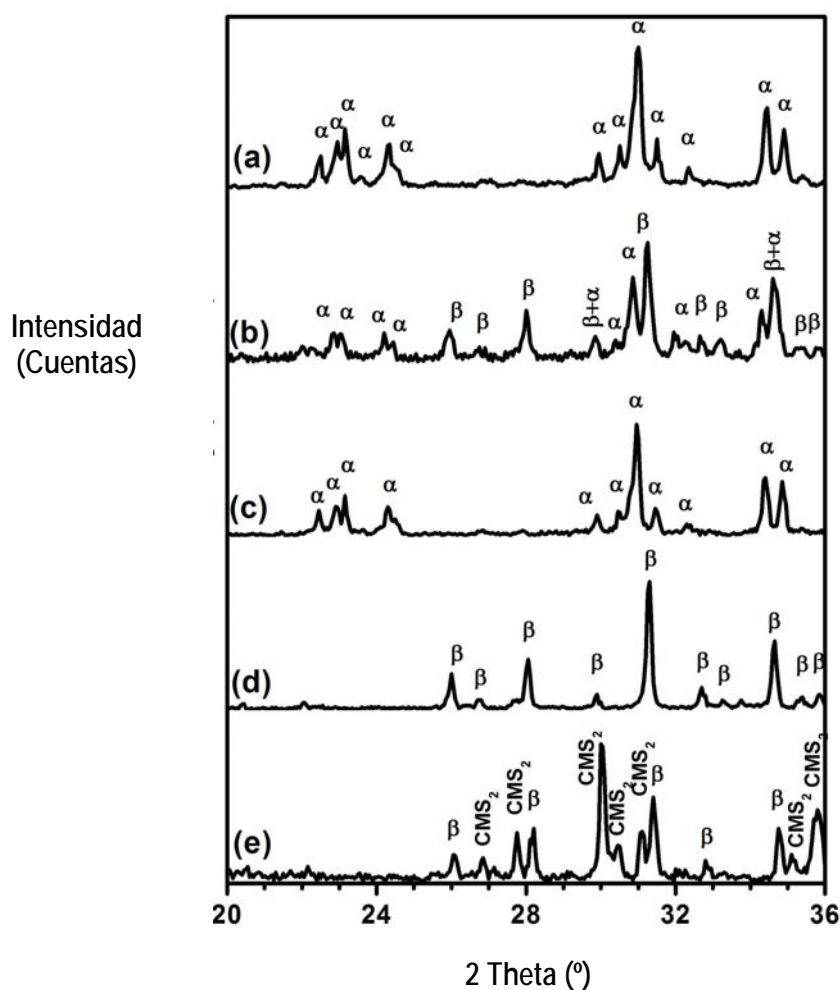
El análisis cualitativo de las fases cristalinas, en equilibrio, a cada temperatura se realizó por DRX. En las composiciones estudiadas se identificaron las fases  $CMS_2$ ,  $\alpha$ - $C_3P$ ,  $\beta$ - $C_3P$ , o una mezcla de ambos polimorfos, dependiendo del contenido de  $CMS_2$  en la muestra y la temperatura del tratamiento térmico.

En la Figura 4.3, se muestran los difractogramas de las muestras C95 y C90 tratadas a diferentes temperaturas. En la muestra C95 tratada a 1450°C/4h, se detecta una única fase cristalina  $\alpha$ - $C_3P$  (Figura 4.3a). Por otra parte en esta composición tratada a 1400 °C/4h se identifican las fases  $\alpha$ - y  $\beta$ - $C_3P$  (Figura 4.3b). Del mismo modo, la única fase cristalina detectada en la muestra C90 tratada a 1450 °C es  $\alpha$ - $C_3P$  (Figura 4.3c). Además, el  $\beta$ - $C_3P$  es la única fase cristalina presente en la muestra C90 tratada a 1400°C/4h (Figura 4.3d). En la Figura 4.3e se muestra el difractograma de la muestra C40 calcinada a 1250°C/4h. Las fases cristalinas identificadas fueron  $\beta$ - $C_3P$  y  $CMS_2$ .

Al analizar la distribución de fases de las muestras C90, C95 y C99 se observa que la temperatura a la cual coexisten las fases  $\alpha$ - y  $\beta$ - aumenta con el contenido de  $CMS_2$ .

#### **4.3.2. Transformación polimórfica del $C_3P$**

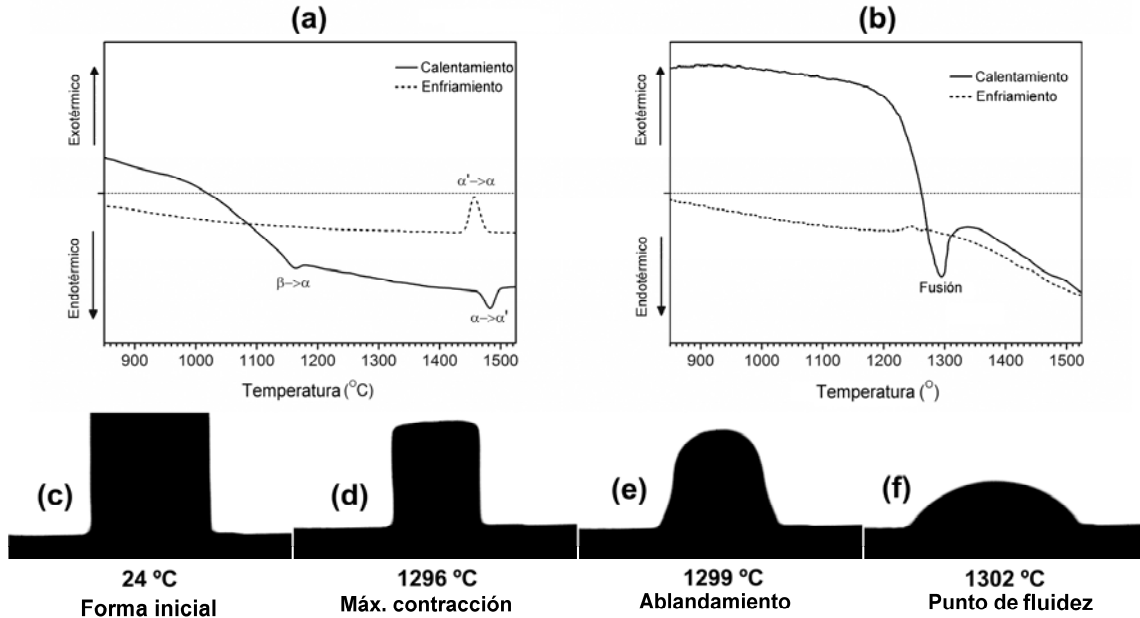
Los resultados del análisis térmico diferencial del  $C_3P$  puro C100 se muestran en la Figura 4.4a. El  $C_3P$  puro (C100) muestra dos picos endotérmicos durante el calentamiento a  $\approx 1165$  y  $\approx 1485$  ° C, respectivamente. Teniendo en cuenta los



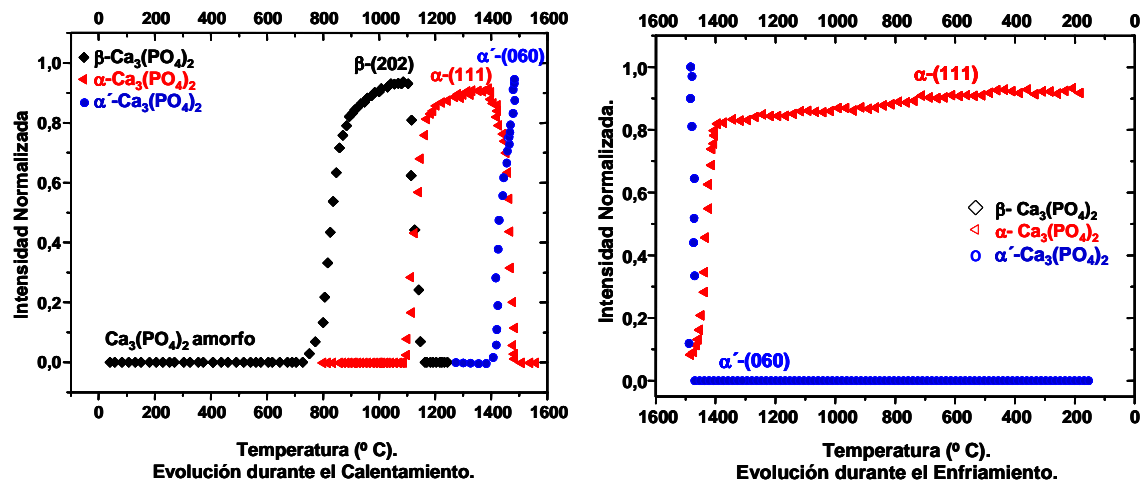
**Figura 4.3.** Difractogramas de rayos X de (a) C95 tratada a 1450 °C por 4 h; (b) C95 tratada a 1400°C por 4 h; (c) C90 tratada a 1450 °C por 4 h; (d) C90 tratada a 1400°C por 4 h y (e) C40 tratada a 1250°C por 4h.  $\beta$ :  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF 09-169);  $\alpha$ :  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF 09-348);  $\text{CMS}_2$ :  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  (PDF 86-0932).

resultados obtenidos por R. García-Carrodegua y col.<sup>(3)</sup> en su estudio por difracción de neutrones (Figura 4.5) acoplado a un horno de alta temperatura en el ILL (Grenoble, Francia), el primero de ellos, se asigna a la transformación polimórfica  $\beta$ - (hexagonal, R3CH (161))  $\rightarrow$   $\alpha$ - $\text{C}_3\text{P}$  (ortorrómbica, P121/A1 (14)) (Apéndice 2) (Figuras 1.5 y 1.6) que tiene lugar con rotura y formación de nuevos enlaces “reconstructiva” es, pues, una transformación lenta y la fase obtenida puede retenerse mediante “quenching”, y el segundo a la transformación polimórfica  $\alpha$ -(P121/A1 (14))  $\leftrightarrow$   $\alpha'$ - $\text{C}_3\text{P}$  (P63/MMC (194)) que tiene lugar con desplazamiento de iones, es rápida y reversible. Durante el enfriamiento se observa una señal exotérmica debida a la transformación  $\alpha' \leftrightarrow \alpha$ - $\text{C}_3\text{P}$  a una temperatura inferior a la de calentamiento ( $\approx 1455$  °C); por último, la transformación reconstructiva inversa  $\alpha \rightarrow \beta$ - $\text{C}_3\text{P}$ , que es inhibida cinéticamente, no

se observa durante el enfriamiento. Esto confirma que la estructura  $\alpha$ - $C_3P$  cuando se enfría hasta temperatura ambiente, a  $10^\circ C \cdot min^{-1}$ , se mantiene en un estado metaestable, como han mencionado otros investigadores anteriormente<sup>(3)</sup>.

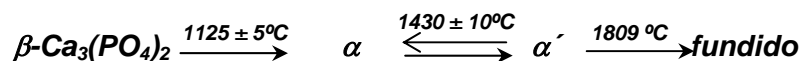


**Figura 4.4.** Análisis térmico diferencial de las muestras (a) C100 y (b) C40, e imágenes obtenidas en el microscopio de alta temperatura de la muestra C40 (c) a (f).



**Figura 4.5.** Variación con la temperatura de la intensidad normalizada de los picos, del difractograma de neutrones, correspondientes a las reflexiones (202) del  $\beta$ - $Ca_3(PO_4)_2$  (rombos), (111) de  $\alpha$ - $Ca_3(PO_4)_2$  (triángulos) y (060) de  $\alpha'$ - $Ca_3(PO_4)_2$  (círculos).<sup>(3)</sup>

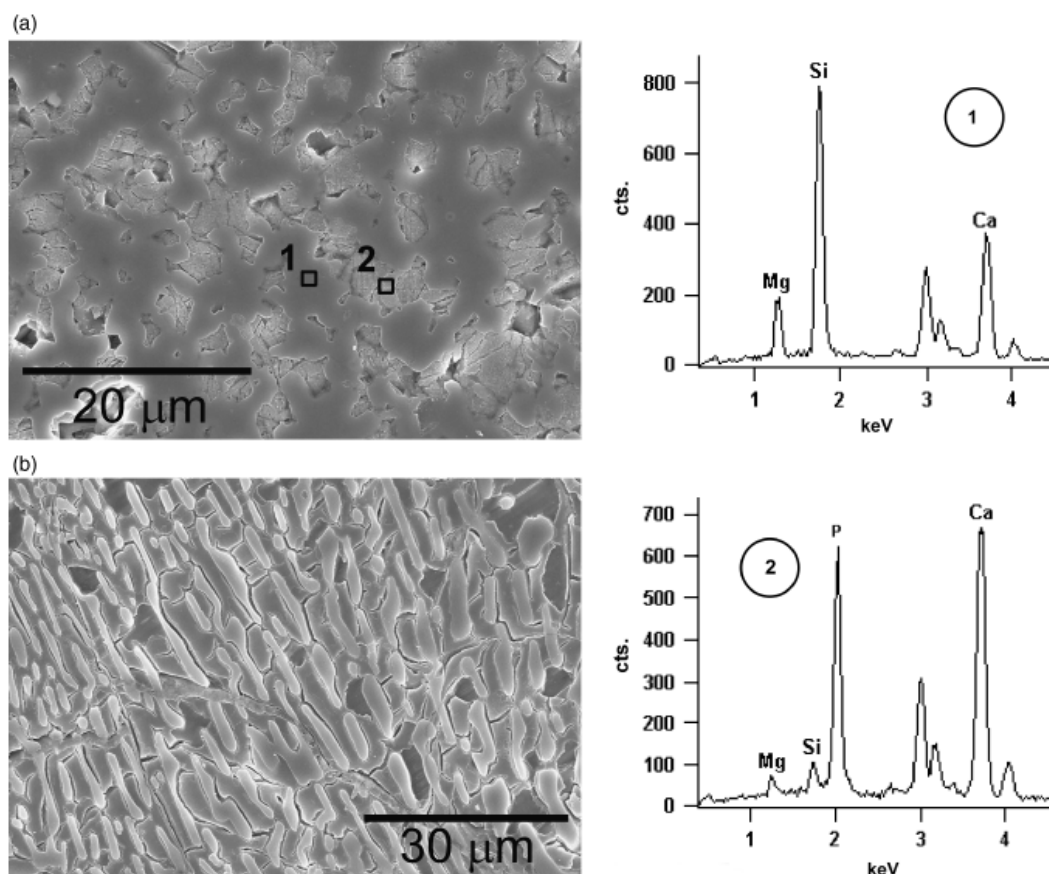
Todas las transformaciones del fosfato tricálcico ultrapuro pueden resumirse en:



Como se muestra en la Figura 4.4b, la muestra C40 no presenta la transformación endotérmica  $\beta \rightarrow \alpha\text{-C}_3\text{P}$ . Sólo se observa un pico endotérmico a  $1300^\circ\text{C}$ . Los estudios realizados en el microscopio de alta temperatura revelaron que el efecto endotérmico observado a  $1300^\circ\text{C}$  corresponde a la fusión de la muestra, como se deduce de las fotografías de las Figuras 4.4c a 4.4f. Por lo tanto, el polimorfo  $\beta\text{-C}_3\text{P}_{\text{ss}}$  es el único presente en la composición C40 hasta que se alcanza la temperatura de fusión.

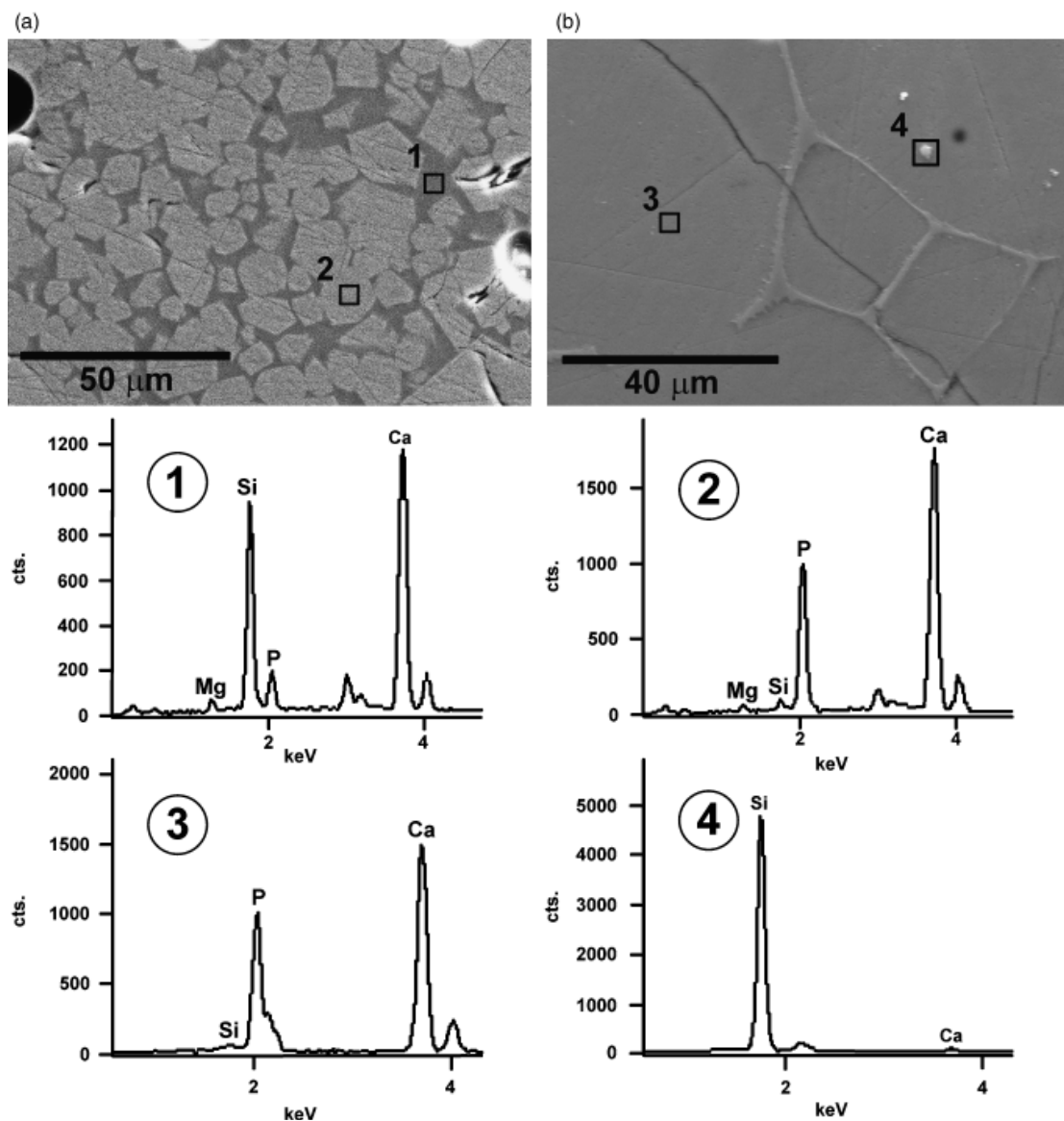
### 4.3.3. Estudio Microestructural

Las micrografías de las Figuras 4.6 a 4.8 muestran microestructuras típicas, de muestras pulidas y atacadas químicamente, después de un enfriamiento brusco con una corriente de aire frío “quenching” desde varias temperaturas.



**Figura 4.6.** Micrografías MEB y espectros EDE de la muestra C40: a) tratada a  $1250^\circ\text{C}/4\text{h}$ ; b) microestructura eutéctica obtenida por enfriamiento lento ( $1^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ) de la muestra fundida a  $1400^\circ\text{C}$ .

La microestructura de la composición C80 tratada a 1310°C/4 horas presenta granos hexagonales primarios de  $\beta\text{-C}_3\text{P}_{\text{ss}}$  (gris claro) de 5-20 micras de ancho, dispersos en una fase vítrea de silico-fosfatos de calcio y magnesio (fase continua de color gris oscuro), líquido a la temperatura del tratamiento térmico, como se muestra en la Figura 4.7a (MEB y EDE). La microestructura de la muestra de esta composición calentada a 1422° C/4 horas está formada por granos de  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  con un tamaño de grano más elevado (30-70 micras), y se observa la presencia de grietas transgranulares. La muestra C90 tratada a 1400°C/4 horas, también mostró una microestructura constituida por granos de  $\beta\text{-C}_3\text{P}_{\text{ss}}$ , 10-60 micras, que coexiste con una fase vítrea, tal como se determinó mediante MOLR y MEB-EC.



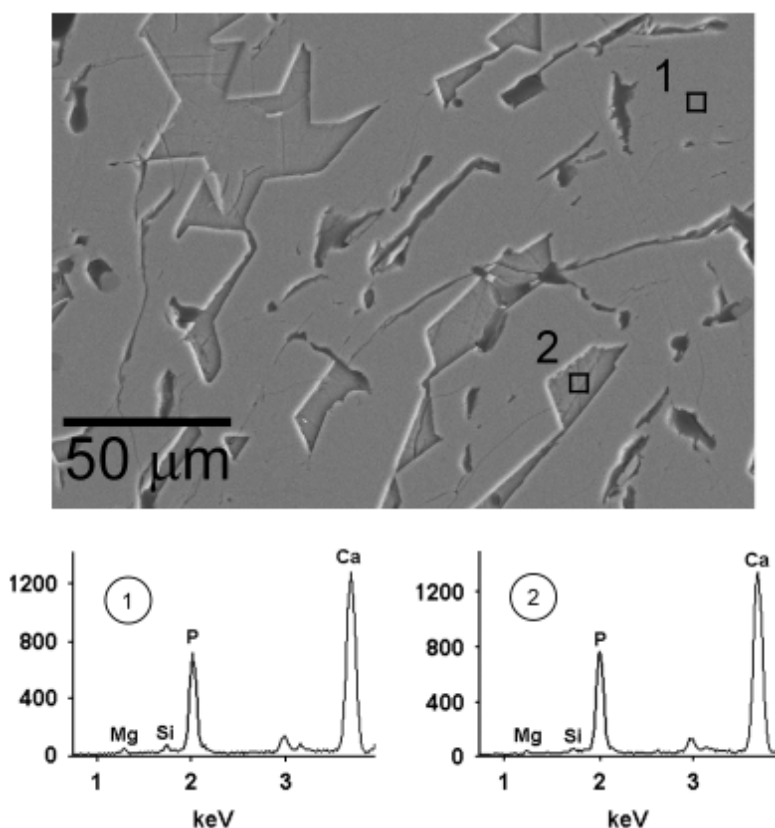
**Figura 4.7.** Micrografías MEB y espectros EDE de las muestras C80 y C95 después del tratamiento térmico por 4 h a 1310 y 1450 °C, respectivamente. (a) C80, y (b) C95.

La microestructura de la composición C95 tratada térmicamente a 1450°C/4 horas está formada por granos redondeados de  $\approx 60$  micras, de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P<sub>ss</sub> con pequeñas cantidades de fase vítrea en los bordes de grano, Figura 4.7b (MEB y EDE). Además, en la mayor parte de los granos de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P<sub>ss</sub> se encontraron zonas ricas en Si que no son atribuibles a contaminación de las muestras.

También se observaron granos similares, al parecer formados en los granos de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P<sub>ss</sub> en la muestras C95 tratada a 1400°C y C99 tratada a 1450 y 1500° C.

En la Figura 4.8 se observa la micrografía MEB de la muestra C95 calcinada a 1400°C/4 horas y enfriada en aire, en ella se observa una microestructura formada por granos de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P<sub>ss</sub> y  $\beta$ -C<sub>3</sub>P<sub>ss</sub>. Los granos más atacados por el ácido acético diluido corresponden a la fase  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P<sub>ss</sub> más soluble que la  $\beta$ -C<sub>3</sub>P<sub>ss</sub>.

La microestructura de la muestra C99 calcinada a 1500°C/4 horas está compuesta por grandes granos redondeados de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P<sub>ss</sub> ( $\approx 100$  micras). Se detectó también la presencia de pequeñas cantidades de fase vítrea en los puntos triples.



**Figura 4.8.** Microfotografía obtenida por MEB-EC y espectro EDE de la muestra C95 calcinada a 1400 °C/4+8 h.



#### **4.3.4. Formación de soluciones sólidas**

Los resultados obtenidos por microanálisis MEB-EDE evidencian la formación de soluciones sólidas de Mg y Si en las redes cristalinas, tanto de  $\alpha$ - $C_3P$  como de  $\beta$ - $C_3P$  (Figuras 4.6 a 4.8). En los espectros de MEB-EDE de todas las composiciones con  $CMS_2$  se detectaron los picos característicos de Si y Mg en los granos de los polimorfos del fosfato tricálcico.

En todos los casos, la relación Si/Mg es más baja que la correspondiente al  $CMS_2$  puro (véase Figuras 4.6 a 4.8), lo que sugiere que el  $CMS_2$  se disuelve incongruentemente en el  $\alpha$ - y en  $\beta$ - $C_3P$ . Los intentos de obtener datos cuantitativos fiables del contenido de Si y Mg en las soluciones sólidas mediante microanálisis por EDE fallaron, debido al bajo contenido de ambos elementos en las soluciones sólidas y al gran fondo (baja relación de señal a fondo) existente en la región en la que aparecen los picos de Mg y Si, lo cual conlleva a errores adicionales.

Por otra parte, el microanálisis semi-cuantitativo de EDE realizado en los granos de  $CMS_2$  en las composiciones C40, C45 y C80 no detectó los picos correspondientes al fósforo, lo que indica que si hay alguna solubilidad de P en la red de  $CMS_2$  debe ser muy pequeña.

Mediante el análisis de los resultados experimentales, se determinaron las fases que coexisten en equilibrio para cada composición después del tratamiento a las temperaturas y tiempos seleccionados. Los resultados se presentan en la Tabla 4.3.

#### **4.4 Discusión de los resultados.**

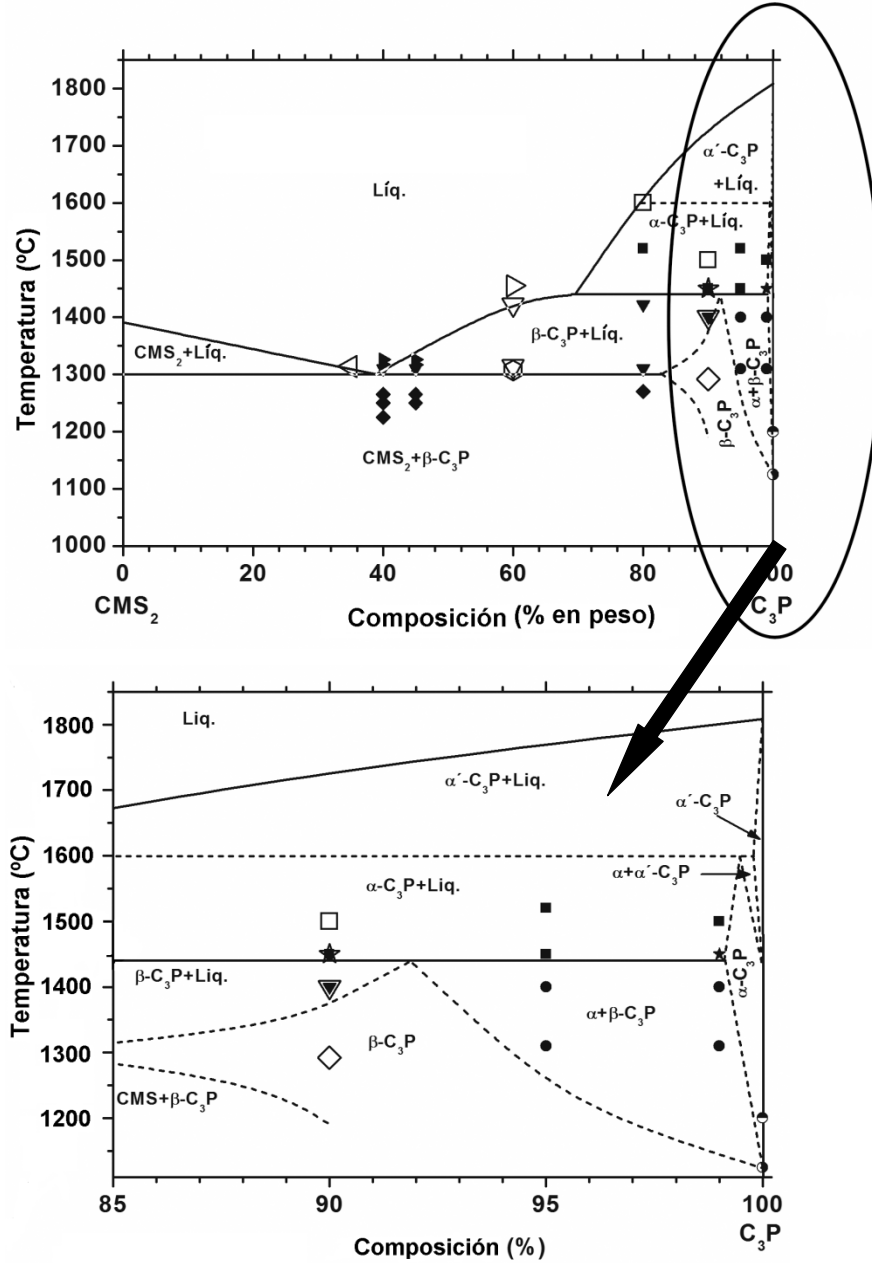
El diagrama de equilibrio de fases para el sistema  $C_3P$ - $CMS_2$  mostrado en la Figura 4.1 se redibujó teniendo en cuenta los resultados experimentales y los datos previamente reportados por Sata<sup>1</sup>, y se obtuvo el diagrama de la Figura 4.9.

Se confirmó la existencia de un punto eutéctico a  $1300^\circ \pm 5^\circ C$  donde  $\beta$ - $[(Ca_{1-x}Mg_x)_3(P_{1-\delta}Si_\delta O_{(4-\delta)/2})_2]$  y  $CaMg(SiO_3)_2$  coexisten, el cual corresponde a la composición 37% en peso de  $C_3P$  y 63% en peso de  $CMS_2$  (ver Tabla 4.4 y Figura 4.9a).

**Tabla 4.3.** Fases identificadas por DRX, MOLR, y/o MEB-EDE para cada composición y tratamiento térmico estudiado. Muestras obtenidas por “quenching”.

Muestra	Temp./Tiempo (°C/h)	Apariencia	Fases observadas
C40	1326/4	Vítreo, Traslúcido	Líquido solidificado
	1317/4	Vítreo, Traslúcido	Líquido solidificado
	1310/4	Vítreo, Opal	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + Líq. sol.
	1265/4	Cristalino, Opaco	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + CMS <sub>2</sub>
	1250/4	Cristalino, Opaco	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + CMS <sub>2</sub>
	1225/4	Cristalino, Opaco	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + CMS <sub>2</sub>
C45	1326/4	Vítreo, translúcido	Líquido solidificado
	1317/4	Vítreo, translúcido	Líquido solidificado
	1310/4	Vítreo, Opal	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + Líq. sol.
	1265/4	Cristalino, Opaco	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + CMS <sub>2</sub>
	1250/4	Cristalino, Opaco	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + CMS <sub>2</sub>
C80	1520/4	Vítreo, translúcido	$\alpha$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + Líq. sol.
	1422/4	Vítreo, Opal	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + Líq. sol.
	1310/4	Cristalino, Opaco	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + Líq. sol.
	1270/4	Cristalino, Opaco	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + CMS <sub>2</sub>
C90	1450/4	Cristalino, Opaco	$\alpha$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + Líq. sol.
	1400/4	Cristalino, Opaco	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + Líq. sol.
	1300/4	Cristalino, Opaco	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub>
C95	1450/4	Cristalino, Opaco	$\alpha$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + Líq. sol.
	1400/4+8	Cristalino, Opaco	$\alpha$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + $\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub>
	1310/4+8	Cristalino, Opaco	$\alpha$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + $\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub>
C99	1500/4+8	Cristalino, Opaco	$\alpha$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + Líq. sol.
	1450/4	Cristalino, Opaco	$\alpha$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + Líq. sol.
	1400/4+8	Cristalino, Opaco	$\alpha$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + $\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub>
	1310/4+8	Cristalino, Opaco	$\alpha$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub> + $\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub>
C100	1200/2	Cristalino, Opaco	$\alpha$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub>
	1100/2	Cristalino, Opaco	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sub>ss</sub>

La temperatura de la transformación  $\beta \rightarrow \alpha$  aumenta con el contenido de  $CMS_2$  desde  $1125^\circ \pm 5^\circ C$  para el  $C_3P$  puro (C100) hasta los  $1440^\circ \pm 10^\circ C$  para la transformación peritética de  $C_3P_{ss}$ .



**Figura 4.9.** Diagrama de fases redibujado del sistema  $C_3P$ - $CMS_2$  incluye campos de fases tentativos para los polimorfos de las soluciones sólidas de  $C_3P$ .  $\blacklozenge$   $CMS_2 + \beta$ - $C_3P_{ss}$ ,  $\star$   $\alpha + \beta$ - $C_3P_{ss} + L\acute{i}q.$ ,  $\bullet$   $CMS_2 + \beta$ - $C_3P_{ss} + L\acute{i}q.$ ,  $\blacktriangledown$   $\beta$ - $C_3P_{ss} + L\acute{i}q.$ ;  $\blacksquare$   $\alpha$ - $C_3P_{ss} + L\acute{i}q.$ ;  $\bullet$   $\alpha + \beta$ - $C_3P_{ss}$ ;  $\blacktriangleleft$   $CMS_2 + L\acute{i}q.$ ,  $\blacktriangleright$  L\acute{i}quido,  $\odot$   $\alpha$ - $C_3P_{ss}$ ;  $\ominus$   $\beta$ - $C_3P_{ss}$ . Símbolos huecos: datos de Sata, símbolos sólidos: datos de este trabajo.

La temperatura de solidus disminuye con el incremento del contenido de CMS<sub>2</sub> desde 1440°±10°C para ≈ 8% en peso de CMS<sub>2</sub> hasta los 1300°±5°C para ≈ 17% en peso de CMS<sub>2</sub>. Las muestras con contenidos mayores a 30% de CMS<sub>2</sub> no presentan la transformación  $\beta \rightarrow \alpha$  y el  $\beta$ -C<sub>3</sub>Pss es la única fase remanente después de la fusión. El punto de fusión peritética de  $\beta$ -C<sub>3</sub>Pss tiene lugar a 1440°±10°C dando como productos  $\alpha$ -C<sub>3</sub>Pss y líquido. Análogamente al sistema Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-Mg<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>,<sup>(3)</sup> hay dos áreas de estabilidad bifásicas donde  $\beta$ - y  $\alpha$ - C<sub>3</sub>Pss, y  $\alpha$ - y  $\alpha'$ - C<sub>3</sub>Pss, respectivamente coexisten en un amplio rango de temperaturas.

**Tabla 4.4.** Puntos invariantes relacionados con el sistema Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> – CaMg(SiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (C<sub>3</sub>P-CMS<sub>2</sub>)

Punto invariante	Fases en equilibrio en el punto invariante	T, (°C)	Composición en el punto invariante, (% en peso)	
			C <sub>3</sub> P	CMS <sub>2</sub>
Eutéctico	$\beta$ -C <sub>3</sub> Pss+CMS <sub>2</sub> +liq.	1300±5	37	63
Peritético	$\beta$ -C <sub>3</sub> Pss+ $\alpha$ -C <sub>3</sub> Pss +liq.	1440±10	70	30

En concordancia con los resultados del análisis elemental cualitativo por EDE del CMS<sub>2</sub> (cuadro 1 de la Figura 4.6) y para C<sub>3</sub>P (cuadro 2 de la Figura 4.6 y cuadro 2 de la Figura 4.7), la relación de intensidades de las señales correspondientes a Si y Mg en los granos de  $\alpha$ - y  $\beta$ - C<sub>3</sub>Pss disminuye con respecto a la intensidades en el CMS<sub>2</sub>. Como la intensidad de la señal de cada elemento es proporcional a su concentración, la relación molar Si/Mg en el C<sub>3</sub>Pss es menor que en el CMS<sub>2</sub>. Luego, la substitución de Ca por Mg es mayor que la substitución de P por Si en ambos,  $\alpha$ - y  $\beta$ - C<sub>3</sub>Pss. Por otra parte, parece ser que la substitución de Si y Mg en  $\alpha$ -C<sub>3</sub>Pss es menor que para  $\beta$ -C<sub>3</sub>Pss. Estos resultados sugieren que la disolución de CMS<sub>2</sub> en C<sub>3</sub>P tiene lugar incongruentemente. Sin embargo, no fueron detectadas en ningún caso nuevas fases cristalinas ricas en Si que pueden ser asociadas a un exceso de Si remanente después de la disolución incongruente. Probablemente, el Si en exceso remanente se disuelve en la fase líquida, cuando está presente, o en la red de CMS<sub>2</sub>,<sup>(5)</sup> o se segrega en forma de nano clusters-amorfos de fase rica en Si como han propuesto por Wei y Akinc para C<sub>3</sub>P codopado con Si y Zn<sup>(5-6)</sup>. Los agregados ricos en Si observados en el interior de los granos de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>Pss en las muestras C95 y C99 tratados a temperaturas por encima de 1400°C soportan la hipótesis de segregación de fases ricas en Si, cuando no hay líquido disponible para disolver el Si liberado durante la transformación de  $\beta$ -  $\rightarrow$   $\alpha$ -C<sub>3</sub>P durante el calentamiento de las muestras.

El aspecto estructural y la extensión de la sustitución de Mg por Ca en  $\beta$ -C<sub>3</sub>P ha sido intensamente investigada<sup>(7)</sup>. El catión Mg<sup>2+</sup> más pequeño (radio iónico octaédrico 72pm) puede sustituir al Ca<sup>2+</sup> (radio iónico octaédrico 100pm), en dos sitios diferentes de la celda unidad del  $\beta$ -C<sub>3</sub>P mostrada en la Figura 1.2, posiciones Ca(4) trigonal planar y Ca(5) octaédrico. Ambos sitios están localizados en la columna A en la secuencia P(1)O<sub>4</sub>-Ca(4)-Ca(5). Se considera que los sitios Ca(5) con ocupación 1 son sustituidos primero y posteriormente se sustituyen los sitios Ca(4) con ocupación 0,5 para lograr un máximo de sustitución de Ca por Mg de 13,6% molar.<sup>(5)</sup>

Similarmente, el catión Si<sup>4+</sup> más grande (radio iónico tetraédrico 26 pm) puede sustituir al P<sup>5+</sup> (radio iónico tetraédrico 17 pm) en el C<sub>3</sub>P en los sitios tetraédricos P(2) y P(3) como se explicará en el capítulo 5. La concentración absoluta de sustitución de Si relativa a los sitios de P disponibles fue de 3,9 o 1,2% molar, dependiendo de si la determinación se realizó por dispersión de neutrones y análisis de Rietveld o por RMN de estado sólido<sup>(6)</sup>.

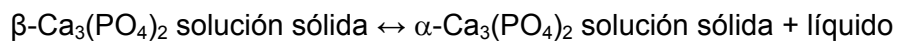
Las consideraciones antes descritas soportan la disolución incongruente de CMS<sub>2</sub> en la red de C<sub>3</sub>P y la variación de la relación molar de Si/Mg en el C<sub>3</sub>Pss en lo que se refiere a CMS<sub>2</sub>. Entonces, siendo totalmente estrictos, el sistema C<sub>3</sub>P-CMS<sub>2</sub> debería ser considerado no un sistema binario sino ternario, sin embargo, en este trabajo será tratado como binario teniendo en cuenta la baja extensión de la disolución y en aras de simplicidad.

En las microestructuras estudiadas se han observado abundantes microgrietas, tanto inter-como transgranulares, que pueden deberse a la acción de concentradores de esfuerzos y son la causa de fallas catastróficas de materiales frágiles durante la carga. Las microgrietas se originan generalmente durante el procesamiento de las muestras cerámicas. Varias son las causas que contribuyen a la formación de grietas: diferencias en los coeficientes de expansión térmica de las fases constituyentes; transiciones de fases que involucran cambios drásticos de densidad y también ciclos rápidos de calentamiento y enfriamiento. Estos defectos se pueden evitar, o al menos minimizar, mediante un diseño apropiado de los procesos de preparación, los cuales requieren un conocimiento exacto del diagrama de equilibrio del sistema involucrado.

## 4.5 Conclusiones

Se han establecido las relaciones de fase en el sistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{--CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  haciendo énfasis en la región rica en  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Se confirmó que el sistema puede ser considerado binario, con un eutéctico a  $1300\pm 5^\circ\text{C}$  y un peritético a  $1440\pm 10^\circ\text{C}$ .

La temperatura de la transformación polimórfica de fase  $\beta \rightarrow \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  cambia con la cantidad de iones Mg y Si en solución sólida en el  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y es máxima para la composición peritética (92 %, en peso de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ).



Así mismo, se han establecido, dos regiones bifásicas, donde coexisten las soluciones sólidas de  $\alpha$ - y  $\beta$ - y de  $\alpha$ - y  $\alpha'\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

## Referencias

- <sup>1</sup>. T. Sata, "Phase relationship in the system  $3\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5$ - $\text{CaO} \cdot \text{MgO} \cdot 2\text{SiO}_2$ - $\text{SiO}_2$ ", *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 32 [2] 105-108 (1959).
- <sup>2</sup>. J. C. Elliot, "Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates", Vol. 18. In: *Studies in Inorganic Chemistry*. Amsterdam: Elsevier Science B. V., (1994).
- <sup>3</sup>. R. García Carrodegua, A. H. De Aza, X. Turrillas, P. Pena, and S. De Aza, "New Approach to the  $\alpha$ - $\beta$  Polymorphic Transformation in Magnesium-Substituted Tricalcium Phosphate and its Practical Implications", *J. Am. Ceram. Soc.*, 91 [4] 1281-1286 (2008).
- <sup>4</sup>. T. Sata, "Phase Relation in the System  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ - $\text{MgSiO}_3$ - $\text{SiO}_2$ ", *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 105 [1] 26-30 (1997).
- <sup>5</sup>. X. Wei and A. Akinc, "Crystal Structure Analysis of Si- and Zn-Codoped Tricalcium Phosphate," *J. Am. Ceram. Soc.*, 90 [9] 2709-15 (2007).
- <sup>6</sup>. A. Rawal, X. Wei, A. Akinc, and K. Schmidt-Rohr, "Dispersion of Silicate in Tricalcium Phosphate Elucidated by Solid-State NMR," *Chem. Mater.*, 20 [7] 2583-91 (2008).
- <sup>7</sup>. K. Yoshida, H. Hyuga, N. Kondo, H. Kita, M. Sasaki, M. Mitamura, K. Hashimoto, and Y. Toda, "Substitution Model of Monovalent (Li, Na, and K), Divalent (Mg), and Trivalent (Al) Metal Ions for  $\beta$ -Tricalcium Phosphate," *J. Am. Ceram. Soc.*, 89 [2] 688-90 (2006).
- <sup>8</sup>. Yashima, M.; Sakai, A.; Kamiyama, T.; Hoshikawa, A. "Crystal structure analysis of beta-tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  by neutron powder diffraction". *Journal of Solid State Chemistry* 175, 272-277 (2003)





**Capítulo 5.**

**SINTESIS Y CARACTERIZACION QUIMICA  
Y MINERALÓGICA DE FOSFATO TRICALCICO.**



La producción de biocerámicas basadas en fosfato tricálcico requiere inicialmente, salvo pocas excepciones, la preparación de polvos de fosfato tricálcico, los cuales son procesados en una etapa posterior para obtener materiales densos o macroporosos, recubrimientos, cementos o compuestos para aplicaciones de relleno, sustitución y/o reconstrucción ósea. Para lograr una buena sinterización y un buen control de la microestructura de las biocerámicas de fosfato tricálcico es necesario que los polvos sean suficientemente puros y finos, para lo cual es esencial el control químico y cerámico durante su producción.

Los métodos habituales para sintetizar fosfatos incluyen a) la mezcla de diferentes fosfatos de calcio seguida de reacción en estado sólido y b) métodos de solución-precipitación. Otros métodos de síntesis también muy utilizados son: el sol-gel, microondas y el método de combustión (que utiliza mezclas de nitratos y fosfatos a los que se añade un componente que inicia la reacción como urea, glicina), y el tratamiento de huesos naturales.

Algunas de las técnicas de síntesis, actualmente en estudio para sintetizar fosfato tricálcico o hidroxiapatita, presentan diferentes inconvenientes, tales como el elevado precio de las materias primas (por ejemplo los alcóxidos metálicos necesarios para la síntesis por sol-gel), los métodos de procesamiento son muy costosos (por ejemplo los agentes criogénicos necesarios para los métodos de liofilización). Aunque muchos de estos métodos son abordables y de gran interés a escala de laboratorio, su aplicación a nivel comercial está limitada, por el momento, debido a su complejidad.

Por ello se considera un objetivo de interés el desarrollar una técnica de preparación de polvos de HAp,  $\beta$ ,  $\alpha$  o  $\alpha+\beta$ -fosfato tricálcico; am-C<sub>3</sub>P, y ap-C<sub>3</sub>P con alta pureza y con adiciones de sílice y magnesio.

Para ello se han estudiado dos métodos de síntesis: a) **método de solución-precipitación** para la obtención de fosfatos de alta pureza y b) **la molienda de atrición de alta energía** como un método para sintetizar polvos altamente reactivos precursores de  $\beta$ ,  $\alpha$  o  $\alpha+\beta$ -C<sub>3</sub>P dopados con pequeñas cantidades de Si y Mg.

Así mismo, se relacionará el método de síntesis con la estructura, y las principales características fisicoquímicas de cada una de las fases.

La obtención de biocerámicos mediante el procesamiento de los polvos obtenidos en el presente capítulo se desarrollará en el capítulo 6.

## 5.1 Revisión Bibliográfica

El fosfato tricálcico se presenta en diferentes fases, cada una de las cuales tiene diferentes ámbitos de formación, es por esto que se cuenta con dos vías de síntesis para la preparación de polvos de  $C_3P$ . El primer método, por solución-precipitación, comprende la precipitación de fosfato tricálcico bajo condiciones experimentales controladas (pH, temperatura, concentración de iones, etc), se utiliza en la preparación de las fases de baja temperatura: am- y ap- $C_3P$ . El segundo método, por reacción en estado sólido, usa procesos a altas temperaturas que son específicamente, más no exclusivamente, utilizados para la síntesis de las dos formas cristalinas de alta temperatura  $\beta$ - $C_3P$  y  $\alpha$ - $C_3P$ .

Para la comprensión de los procesos que se presentan durante la obtención de los materiales por solución-precipitación, se hace necesaria una revisión de la química de las soluciones de fosfatos de calcio que incluye el estudio del comportamiento de las constantes del producto de solubilidad y las curvas de solubilidad. Además, para la comprensión de los procesos que ocurren en la ruta de reacción en estado sólido se hará una revisión de la estabilidad térmica de los diversos compuestos de  $C_3P$ .

### 5.1.1 Fundamentos físico-químicos de los procesos de obtención de polvos de fosfato tricálcico por solución-precipitación

Los fosfatos de calcio pueden clasificarse en metafosfatos, que contienen grupos  $PO_3^-$ ; pirofosfatos, con grupos  $P_2O_7^{4-}$ ; y ortofosfatos, que contienen grupos  $PO_4^{3-}$ . En principio para aplicaciones biomédicas sólo son de interés los ortofosfatos, ya que los pirofosfatos y los metafosfatos en contacto con los fluidos fisiológicos se hidrolizan convirtiéndose en ortofosfatos<sup>(1)</sup>. Además, los pirofosfatos o metafosfatos en concentraciones elevadas en los fluidos corporales pueden causar calcificaciones extraóseas<sup>(2)</sup>.

En general, la precipitación de un compuesto a partir de una solución acuosa tiende a ocurrir cuando la solución acuosa está sobresaturada de este compuesto, mientras que la disolución de un compuesto ocurrirá cuando la solución acuosa que le rodea está infrasaturada de este compuesto. Las fuerzas motrices que controlan las reacciones de disolución y precipitación están relacionadas con el grado de sobresaturación e infrasaturación definidos respecto del producto termodinámico de solubilidad.

La constante del producto termodinámico de solubilidad, o Kps, describe el estado de equilibrio entre un compuesto mineral y la fase acuosa. Para un compuesto con una composición general  $A_aB_bC_cX_kY_lZ_m$  el producto de solubilidad puede escribirse como:

$$Kps = (A)^a(B)^b(C)^c(X)^k(Y)^l(Z)^m \quad \{5.1\}$$

donde las cantidades entre paréntesis son las actividades iónicas en el equilibrio<sup>(3,4)</sup>.

En la Tabla 5.1. se presentan los valores de las constantes del producto de solubilidad (Kps) de los principales fosfatos de calcio a 25 y 37 °C. Los fosfatos de calcio están listados en orden creciente de la relación molar calcio a fósforo, Ca/P. Este orden también coincide con el aumento de la basicidad de las sales<sup>(5,6)</sup>.

Si se considera el sistema ternario  $Ca(OH)_2$ - $H_3PO_4$ - $H_2O$ , con dos fases, una solución y una sal sólida, en equilibrio a una temperatura y presión determinadas, según la regla de las fases de Gibbs se tendrá un único grado de libertad. Por tanto, la composición de todas las soluciones saturadas respecto a una sal vendrá definida por una línea, la cual se conoce como la isoterma de solubilidad de dicha sal.

La isoterma de solubilidad de una sal de fosfato de calcio se puede calcular a partir de la constante del producto de solubilidad, las constantes de disociación del ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) y del hidróxido cálcico ( $Ca(OH)_2$ ), las constantes de estabilidad de los diferentes complejos formados, y un modelo apropiado para calcular los coeficientes de actividad de las distintas especies químicas involucradas en el proceso<sup>(3)</sup>. En muchos casos es necesario utilizar complejos sistemas de cálculo por ordenador para tener en cuenta todas las posibles interacciones y poder obtener resultados y conclusiones<sup>(6)</sup>.

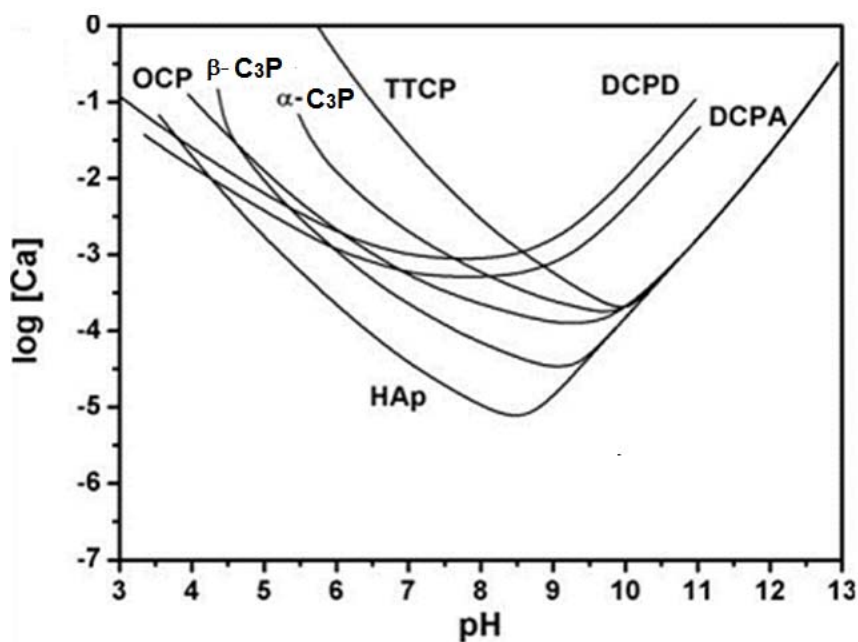
**Tabla 5.1** Constantes del producto de solubilidad de los principales fosfatos de calcio a 25 y 37°C.

Ca/P	Compuesto	Fórmula química	$-\log(K_{ps})$ a 25°C	$-\log(K_{ps})$ a 37°C
0,5	Fosfato monocalcico monohidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Muy soluble	--
0,5	Fosfato Monocalcico anhidro (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	Muy soluble	--
1	Fosfato dicalcico dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,59	6,63
1	Fosfato dicalcico anhidro (DCPA)	$\text{CaHPO}_4$	6,90	7,02
1,33	Fosfato Octacalcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96,6	95,9
1,5	Fosfato tricalcico alfa ( $\alpha\text{-C}_3\text{P}$ )	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25,5	25,5
1,5	Fosfato tricalcico beta ( $\beta\text{-C}_3\text{P}$ )	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	29,5
1,67	Hidroxiapatita (HAp)	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$	58,4	58,6
2,0	Fosfato tetracalcico (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38-44	42,4

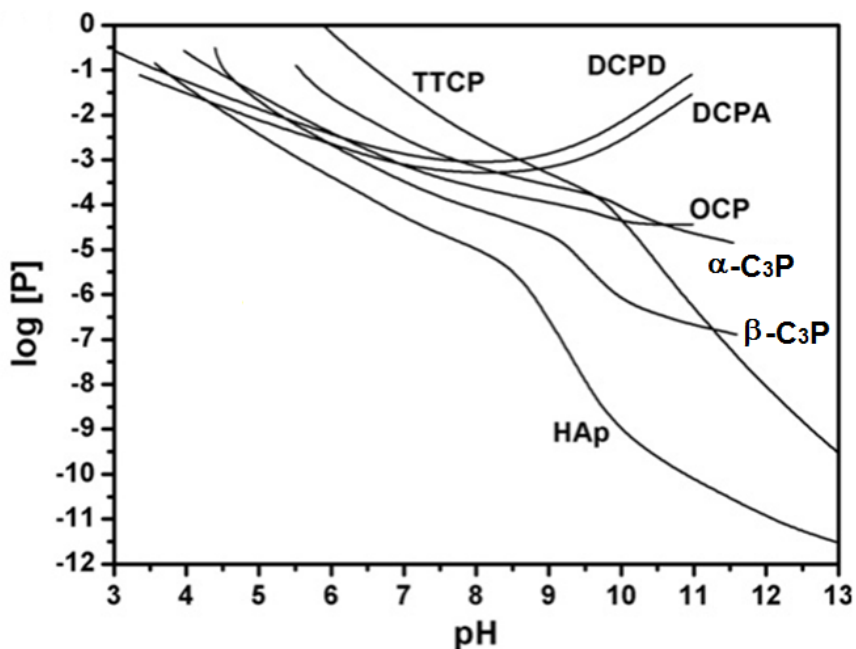
En las Figuras 5.1 y 5.2 se muestran dos versiones de los diagramas de solubilidad para siete sales de fosfatos de calcio a 37°C: el fosfato tetracalcico (TTCP), el fosfato dicalcico dihidratado (DCPD), el fosfato dicalcico anhidro (DCPA), el fosfato octacalcico (OCP), el fosfato tricalcico alfa ( $\alpha\text{-C}_3\text{P}$ ), el fosfato tricalcico beta ( $\beta\text{-C}_3\text{P}$ ) y la hidroxiapatita (HAp)<sup>(7)</sup>. En los cálculos se han tenido en cuenta los valores de las constantes del producto de solubilidad de la Tabla 5.1. En la Figura 5.1 se representa el logaritmo de la concentración de iones calcio,  $\log [\text{Ca}]$ , de la solución saturada en función del pH. La Figura 5.2 es análoga y muestra el logaritmo de la concentración de iones fósforo,  $\log [\text{P}]$ , frente al pH para las mismas soluciones saturadas.

Los diagramas que se muestran en las Figuras 5.1 y 5.2 son válidos solo para el sistema ternario  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  a 37°C. Esto quiere decir que las composiciones que se describen en estos diagramas se han obtenido equilibrando una determinada sal en una solución acuosa solo de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) o de hidróxido de calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) y no en una solución que contenga otro tipo de compuestos diferentes a los del sistema ternario que se está considerando. Por tanto, al interpretar los diagramas se debe tener en cuenta que las variaciones en el pH implican simultáneamente una

variación en la concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$  o iones fosfato presentes en la solución procedentes de la disociación del ácido fosfórico o el hidróxido cálcico.



**Figura 5.1.** Isotermas de solubilidad de soluciones en equilibrio con distintas sales de fosfatos de calcio en el sistema ternario  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$  a  $37^\circ\text{C}$  en una representación de  $\log [\text{Ca}]$  frente al pH



**Figura 5.2** Idem a 5.1 pero en una representación del  $\log[\text{P}]$  frente al pH

Una característica común de las isotermas de las figuras anteriores es que tienen pendientes negativas en las regiones neutras y ácidas ( $\text{pH} < 7$ ) de los diagramas de solubilidad. Esto indica que estos compuestos son más solubles a medida que decrece el pH.

El valor de la pendiente de la isoterma da una idea del aumento de la solubilidad de la sal a medida que el pH decrece. Por este motivo, la pendiente de la isoterma se suele tomar como un parámetro indicativo de la basicidad de la sal. Para un mismo decremento en el valor del pH la solubilidad de una sal básica aumentará más que la de una sal ácida. Por ejemplo, en el diagrama de la Figura 5.1 puede verse que el DCPD y DCPA, que son sales ácidas, tienen pendientes negativas menores que las sales básicas de OCP,  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$ ,  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ , HAp y TTCP.

En las regiones alcalinas de los diagramas de solubilidad, con la excepción del DCPD y el DCPA, la concentración de fósforo,  $[\text{P}]$ , disminuye al aumentar el pH (ver Figura 5.2). Esto indica que las sales básicas se hacen menos solubles al aumentar el pH, mientras que las sales ácidas se hacen más solubles.

Las Figuras 5.1 y 5.2 proporcionan información valiosa acerca de las estabilidades relativas de las distintas sales para diferentes valores del pH. En general, como ya se ha comentado, para un valor dado de pH las sales serán más estables, y por lo tanto menos solubles, que las sales con isotermas por encima de las de ellas.

A partir del diagrama de solubilidad de la Figura 5.1 puede verse que a  $37^\circ\text{C}$  la HAp es la sal menos soluble de todas para pHs mayores de 4,2. Por debajo de este valor la sal menos soluble es el DCPA. De forma similar se puede observar que para pH menores de 8,5 ( $\text{pH} < 8,5$ ) la sal más soluble es el TTCP mientras que para pH mayores de 8,5 ( $\text{pH} > 8,5$ ) la sal más soluble es el DCPD.

El punto de intersección de dos isotermas se conoce con el nombre de *punto singular* y define un estado de equilibrio metaestable. Cuando se prepara una suspensión con cantidades suficientes de dos sales de fosfatos de calcio en agua, ambas se disolverán hasta que la solución esté saturada respecto a las dos sales simultáneamente, alcanzándose el estado de equilibrio metaestable representado el punto singular. Esta evolución espontánea de la solución hacia la intersección de dos



isotermas de solubilidad se llama *efecto de atracción de los puntos singulares*<sup>(6)</sup>. El sistema puede permanecer en este estado de equilibrio metaestable, o tender hacia un equilibrio termodinámico estable, produciéndose la precipitación de otro compuesto cuya isoterma esté por debajo del punto singular. De hecho, las estabilidades relativas entre las distintas sales serán la fuerza motriz de las posibles reacciones químicas que ocurran en materiales basados en fosfatos de calcio.

### **5.1.2 Síntesis de las fases de fosfato tricálcico por solución-precipitación**

El am-C<sub>3</sub>P puede sintetizarse por el proceso de solución-precipitación siguiendo distintos métodos. Uno de los métodos de preparación más conveniente es la doble descomposición entre una solución de sales de calcio y una solución salina de fosfato de hidrógeno, en medio acuoso a temperatura ambiente y a un pH cercano a 10<sup>(8,9)</sup>. Los tiempos de mezclado de las dos soluciones, el tiempo de envejecimiento y la relación Ca/P inicial influyen en la composición de la fase amorfa, especialmente en la relación Ca/P. Un segundo método de preparación de am-C<sub>3</sub>P, incluye una solución hidroalcohólica (agua-etanol)<sup>(10,11)</sup>, la presencia de etanol en el medio de precipitación influye en la composición de la fase amorfa y especialmente en el contenido de HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y en la relación Ca / P.

Las principales dificultades en la preparación de am-C<sub>3</sub>P se relacionan con su inestabilidad y su reactividad. En general, el am-C<sub>3</sub>P no se puede obtener a un pH neutro o ligeramente ácido. Sin embargo, se puede estabilizar mediante la adición de varios iones minerales o moléculas orgánicas, en las soluciones de precipitación y/o lavado. Por ejemplo, el am-C<sub>3</sub>P se puede preparar en condiciones más ácidas (pH≈6) y en presencia de iones de magnesio o citrato, conocidos como inhibidores del crecimiento de los cristales de la fase de apatita<sup>(12)</sup>.

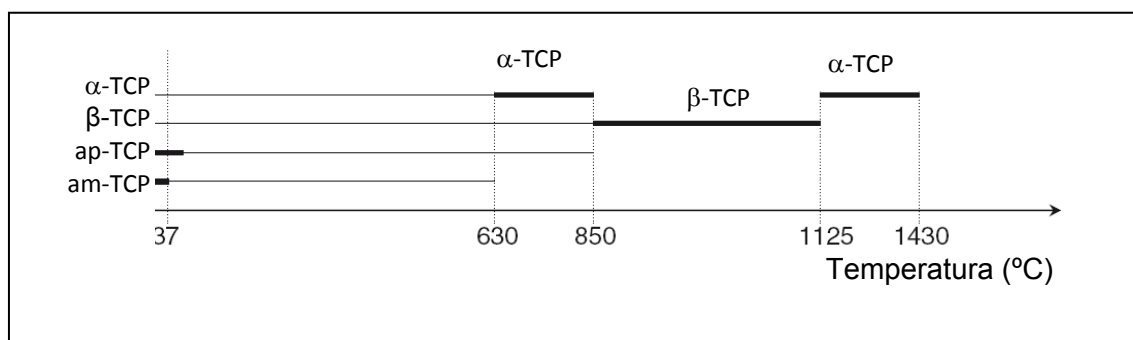
Aunque el secado de los precipitados se puede realizar mediante calentamiento, y posterior almacenamiento a temperatura ambiente en atmósfera seca, se prefiere generalmente su liofilización y almacenamiento a -18°C para evitar cualquier reacción posterior debido a su reactividad y a su alto contenido de agua.

El ap-C<sub>3</sub>P puede sintetizarse por los mismos métodos descritos para la preparación de am-C<sub>3</sub>P, con la diferencia que la etapa de secado se debe realizar a 80°C con el fin de permitir que ocurra la hidrólisis interna y la cristalización de la apatita<sup>(8,10)</sup>.

### 5.1.3 Fundamentos físico-químicos de los procesos de obtención de polvos de fosfato tricálcico por reacción en estado sólido

El método de obtención de materiales por reacción en estado sólido comprende el procesamiento de las materias primas a elevadas temperaturas para que tenga lugar la difusión de iones necesaria para que ocurran las reacciones y transformaciones de fase que conducen a la obtención del producto deseado. Por tanto, para la comprensión de estos procesos se hace necesaria la revisión de la estabilidad térmica de las materias primas y los productos a obtener.

Las áreas de formación y de estabilidad térmica de las diferentes fases de  $C_3P$  están esquematizadas en la Figura 5.3. Las fases am- $C_3P$  y ap- $C_3P$  son fases que solo son estables a baja temperatura, su descomposición térmica da lugar a la formación de los distintos polimorfos del fosfato tricálcico  $\alpha$ - y  $\beta$ -  $C_3P$ . Durante las transformaciones polimórficas del  $C_3P$  no ocurre ninguna variación de la relación Ca/P. La calcinación del ap- $C_3P$  da lugar a su descomposición y a la formación de la fase estable  $\beta$ - $C_3P$  sin formación de fases transitorias<sup>(13)</sup>. El am- $C_3P$  puro se mantiene amorfo hasta aprox.  $630^\circ C$ <sup>(14)</sup>, por encima de esta temperatura, cristaliza primero la fase  $\alpha$ - $C_3P$  metaestable generalmente asociada a pequeñas fracciones de  $\beta$ - $C_3P$  y, alrededor de  $850^\circ C$ , se transforma en  $\beta$ - $C_3P$  puro. Sin embargo, el am- $C_3P$  dopado con magnesio (o con otros elementos que estabilizan la fase  $\beta$ - $C_3P$  como el Fe y Zn) se transforma directamente en la fase  $\beta$ - $C_3P$  sin la formación intermedia de  $\alpha$ - $C_3P$ .



**Figura 5.3.** Áreas de formación (líneas gruesas) y áreas de estabilidad (líneas finas) de las diferentes fases de fosfato tricálcico (adaptado de Rey et.al.<sup>(15)</sup>).

El  $\beta$ - $C_3P$ , es estable desde la temperatura ambiente hasta su temperatura de transición a  $\alpha$ - $C_3P$  ( $1125 \pm 5^\circ C$ ). La temperatura de transición entre las fases  $\beta$ - y  $\alpha$ - $C_3P$

puede variar dependiendo de las impurezas, así elementos como el Mg, el Zn, el Sr o el Na, que ocupan sitios de Ca en la red cristalina del fosfato tricálcico, estabilizan el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, mientras que el Si que ocupa sitios de fósforo estabiliza la fase  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2.** Radio iónico de distintos iones que pueden sustituir al Ca o al P.

Ion	Ca <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	P <sup>5+</sup>	Si <sup>4+</sup>
Número de coordinación	6	6	6	6	4	4
Radio iónico (Å)	0.99	0.65	0.74	0.95	0.17	0.26

El  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P es la forma estable del fosfato tricálcico en el rango de 1125°C a 1430°C<sup>(16)</sup>. El  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P es considerada una fase metaestable a temperatura ambiente, Sin embargo, mediante enfriamiento rápido desde temperaturas superiores a 1125°C, se puede preservar la fase  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P hasta temperatura ambiente. Se ha sugerido, en base a estudios termodinámicos y de resonancia magnética nuclear (RMN)<sup>(17,18)</sup>, que el  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P formado por cristalización térmica del am-C<sub>3</sub>P podría ser más estable y contener menos defectos que la fase  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P obtenida por enfriamiento desde temperaturas por encima de la temperatura de transición  $\beta$ -  $\rightarrow$   $\alpha$ -C<sub>3</sub>P.

El am-C<sub>3</sub>P y el ap-C<sub>3</sub>P pueden tener composiciones diferentes a su composición estequiométrica dependiendo del método de preparación y las condiciones de calentamiento, lo que no ocurre con las fases puras estables a altas temperaturas, en las que no se ha detectado la formación de fases no-estequiométricas. Sin embargo, en todas las fases polimórficas del C<sub>3</sub>P son posibles una o varias substituciones iónicas, no obstante, solo algunas tienen interés biológico.

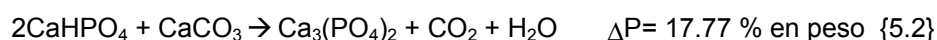
#### **5.1.4 Síntesis de las fases polimórficas de fosfato tricálcico mediante reacción en estado sólido**

Además de los métodos de solución-precipitación, el am-C<sub>3</sub>P también se puede obtener por reacción en estado sólido a alta temperatura, mediante enfriamiento rápido del fosfato de calcio fundido. En ausencia de iones diferentes al Ca<sup>2+</sup> y al PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, la fase amorfa que se forma es análoga al am-C<sub>3</sub>P anhidro precipitado<sup>(19)</sup>. Sin embargo, en la práctica, en la fase amorfa de alta temperatura se observa la presencia de otros aniones tales como el O<sup>2-</sup>, que aumentan la relación atómica Ca/P (> 1,50).

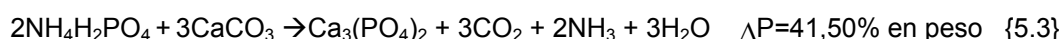
El  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P y el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, a diferencia de los fosfatos tricálcicos amorfo y apatítico, no se pueden sintetizar directamente por precipitación desde sistemas acuosos. Estas dos formas cristalinas de fosfato tricálcico anhidro se obtienen mediante un tratamiento adecuado de alta temperatura de am-C<sub>3</sub>P y/o ap-C<sub>3</sub>P o, en general, de cualquier mezcla de sales de Ca-P con la relación Ca/P adecuada.

El tratamiento térmico, en aire, de las fases am-C<sub>3</sub>P y ap-C<sub>3</sub>P a 900°C durante varias horas conduce a la formación de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, por lo tanto este es uno de los métodos para preparar esta fase con alta pureza. Cuando la relación atómica de los C<sub>3</sub>P's no es exactamente 1,50, aparecen impurezas tales como HAp (para Ca/P > 1,50) y  $\beta$ -C<sub>2</sub>P (para Ca/P < 1,50), las cuales se pueden detectar por DRX y/o FTIR.

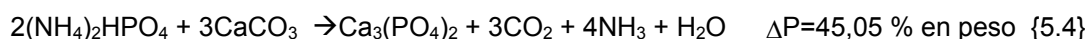
Las dos fases,  $\alpha$ - y  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, se pueden sintetizar también a partir de otras materias primas y, más convenientemente, a partir de mezclas de fases Ca-P con una relación global de Ca/P de 1,50. Por ejemplo, se pueden obtener mediante calentamiento de una mezcla íntima de CaHPO<sub>4</sub> (DCPA) y CaCO<sub>3</sub><sup>(20,21)</sup> según la reacción 5.2:



O usando como materias primas CaCO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> según la reacción 5.3:



Otros autores<sup>(22,23)</sup> han utilizado la mezcla de CaCO<sub>3</sub> con (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, para producir el C<sub>3</sub>P según la reacción 5.4:



En los tres casos, se obtiene  $\beta$ -C<sub>3</sub>P si el proceso se realiza entre 800 y 1100°C, o  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P si realiza a T>1150°. El calentamiento debe hacerse durante un tiempo mínimo de un día, y si el producto requerido es  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P se debe hacer un enfriamiento rápido “quenching” en nitrógeno líquido, por ejemplo.

En cualquier caso se puede obtener  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P desde  $\beta$ -C<sub>3</sub>P y viceversa, en el primer caso se realiza un calentamiento del  $\beta$ -C<sub>3</sub>P por encima de 1125°C (la temperatura de

transición  $\beta \rightarrow \alpha$ ), seguida de enfriamiento rápido “quenching” y para el segundo caso el  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P se debe tratar a una temperatura de 900°C por un tiempo prolongado (hasta transformación completa del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P).

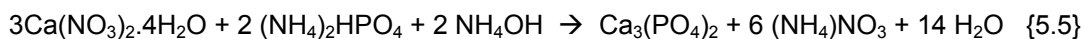
El  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P también se puede obtener como una fase transitoria a temperaturas por debajo de 1125°C (entre 630 y 850°C), sin embargo con este método corrientemente se obtiene un producto que contiene trazas de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P<sup>(14,18)</sup>.

Del análisis de la revisión bibliográfica se decidió sintetizar polvos de fosfatos cálcicos por dos métodos diferentes, uno en el que inicialmente se sintetizará ap-C<sub>3</sub>P por solución-precipitación y por posterior calcinación se obtiene el fosfato, y, otro en el que se obtendrá el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P por reacción en estado sólido con una etapa previa de activación mecánica mediante molienda de atrición con bolas de circona parcialmente estabilizada en medio líquido (alcohol isopropílico). El primer método, con mayor número de etapas y de control complejo, se ha utilizado con el fin de obtener los polvos de elevada pureza necesarios para la fabricación y estudio de las biocerámicas de C<sub>3</sub>P puro, y el segundo método, más fácil de controlar y capaz de producir tandas de  $\approx$ 100 gr, se ha utilizado para obtener polvos que no requieren extrema pureza y que se usarán para la fabricación de biocerámicas de C<sub>3</sub>P dopadas con Si y Mg.

## **5.2 Síntesis de $\beta$ -C<sub>3</sub>P previa síntesis de ap-C<sub>3</sub>P por solución-precipitación**

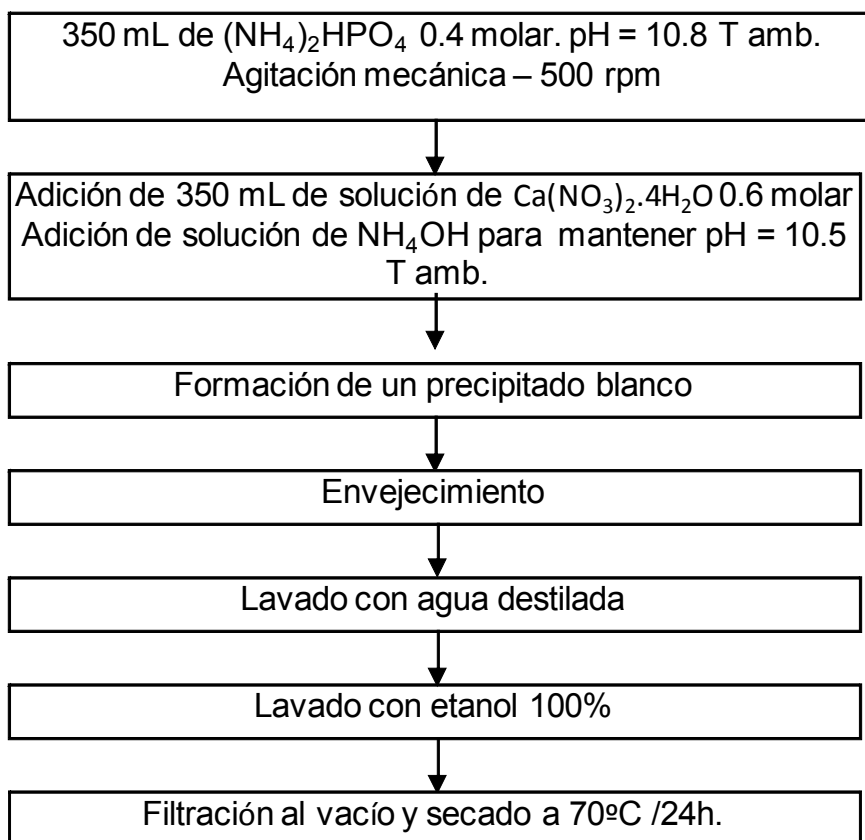
### **5.2.1 Procedimiento Experimental**

Los polvos de fosfatos cálcicos apatíticos, ap-CaP, se han preparado por el método de solución-precipitación en medio acuoso mediante adición de una solución de nitrato de calcio Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O; (Panreac) en un reactor que contenía una solución de fosfato de diamonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Panreac).



El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente y manteniendo el pH entre 10 y 10,5 mediante adición de hidróxido de amonio (NH<sub>4</sub>OH, Panreac). La adición de la solución de nitrato de calcio se ha realizado: a) mediante premezcla y b) mediante goteo a una velocidad de 200mL/hora controlado mediante una bomba peristáltica. Después de adicionar la totalidad de la solución de nitrato de calcio, la suspensión se

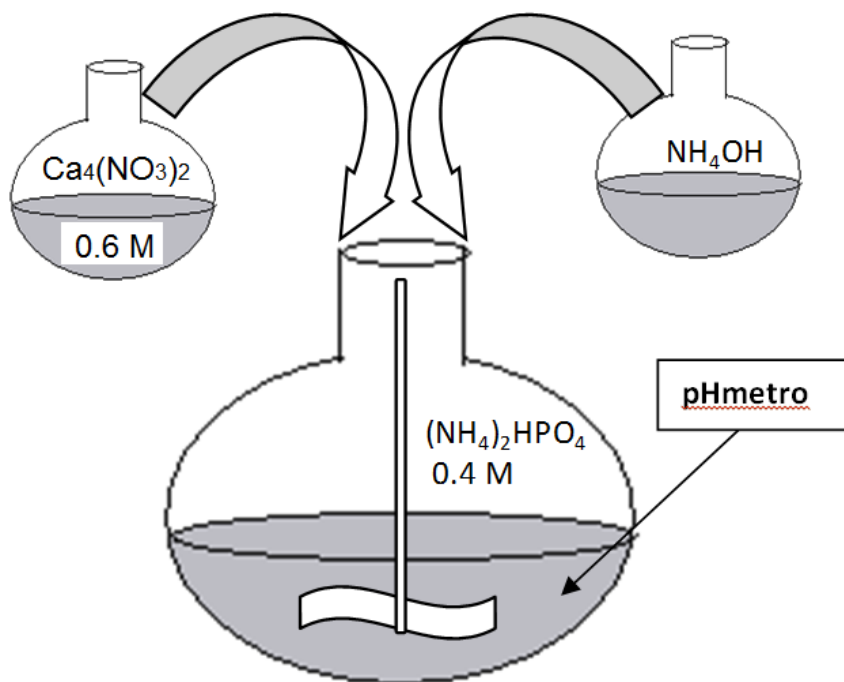
mantuvo en maduración o envejecimiento: a) 5 minutos y b) 12 horas. La suspensión se ha agitado continuamente durante todo el proceso de adición y envejecimiento. El producto resultante se ha lavado y filtrado primero con agua y después con etanol. El producto obtenido se ha secado a 70°C durante 16 horas para dar lugar a la reacción de hidrólisis y la cristalización del fosfato de calcio. Los polvos obtenidos se han molido en mortero de ágata y tamizado a través de un tamiz con una luz de malla de 100 micras. Posteriormente se han sometido a diferentes tratamientos térmicos con el fin de establecer los márgenes de estabilidad de las distintas fases polimórficas del  $C_3P$ . El diagrama de flujo utilizado y un esquema del montaje usado en cada una de las síntesis se presentan en las Figuras 5.4 y 5.5.



**Figura 5.4.** Esquema del proceso de obtención de fosfato tricálcico por solución-precipitación en medio acuoso.

El comportamiento térmico de los productos obtenidos después del secado a 70°C se ha establecido mediante análisis térmico (ATD-TG). El análisis químico de los polvos obtenidos por calcinación a 800°C/4h se ha determinado mediante fluorescencia de rayos X, la densidad por picnometría de He, el área superficial específica mediante el

método cromatográfico usando BET y el tamaño de partícula utilizando un analizador laser. Además se ha establecido la composición mineralógica de los productos secados a 70°C, y de los calcinados a diferentes temperaturas mediante DRX y espectroscopías Raman y RMN de  $^{31}\text{P}$ . Los detalles de las técnicas experimentales se presentan en el capítulo 3.



**Figura 5.5.** Montaje de laboratorio para el proceso de obtención de fosfato tricálcico por solución-precipitación en medio acuoso.

## 5.2.2 Resultados Experimentales

### 5.2.2.1 Caracterización de los ap-CaP's obtenidos por vía húmeda

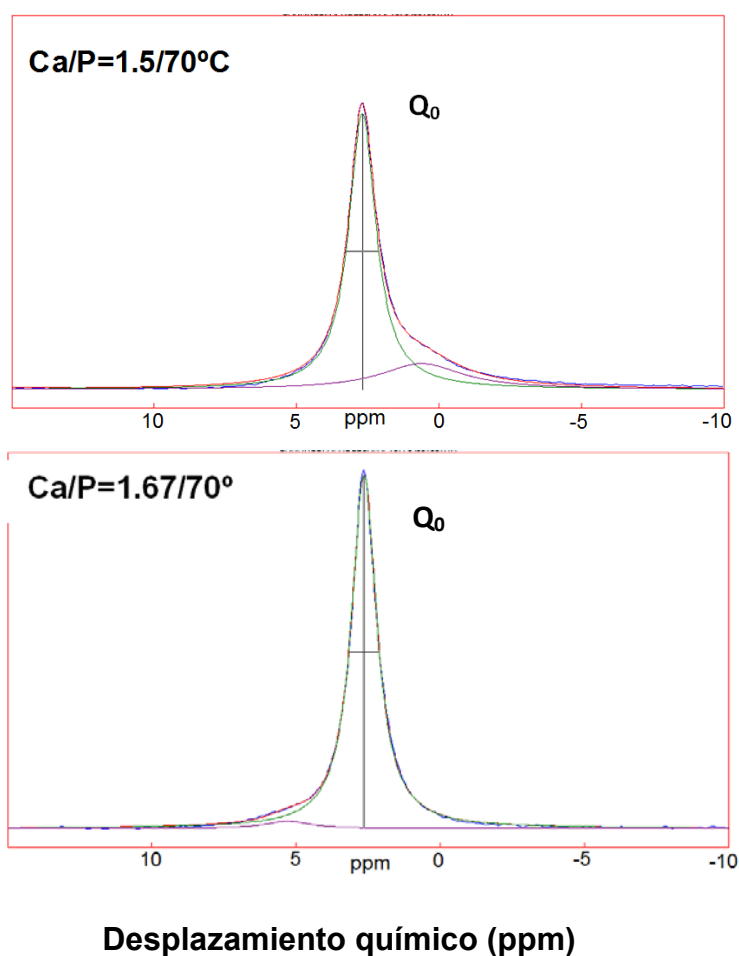
El análisis cualitativo de las fases cristalinas presentes en los polvos obtenidos después del secado a 70°C se ha realizado por DRX, los difractogramas obtenidos se presentan en las Figuras 5.8 a 5.10. Los difractogramas de polvo de los tres materiales son muy similares y los tres corresponden a fosfatos de calcio apatítico ya que los picos, anchos y mal definidos son característicos de una apatita no estequiométrica (Figuras 5.8 a 5.10).

En la Tabla 5.3 se presentan los resultados del análisis químico realizado por FRX y las características físico-químicas de los distintos fosfatos de calcio obtenidos después

de su calcinación a 800°C para las diferentes condiciones de procesamiento estudiadas (etapas de mezclado y envejecimiento).

Con objeto de establecer diferencias entre precipitados tan pobremente cristalizados se recurrió a la técnica de RMN.

El espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  del polvo con una relación  $\text{Ca/P}=1.5$ , experimento 4 en Tabla 5.3 y Figura 5.6, presenta dos picos con un desplazamiento químico centrado a  $\approx 2,69$  ppm y 0,61 ppm respectivamente.



**Figura 5.6.** RMN  $^{31}\text{P}$  correspondiente a los fosfatos de calcio apatíticos. Espectro experimental, componentes ajustados a una laurenciana /gausiana y suma de los componentes.

El primer pico, que corresponde a  $\approx 80\%$  del P, con una anchura de 1,16 ppm se atribuye a una apatita pobremente cristalizada (grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  aislados,  $Q^0$ ); mientras



que el segundo pico con una anchura de 3,51 ppm, que corresponde a  $\approx 20\%$  del P, se atribuye a grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  con un entorno diferente<sup>(24)</sup> (puede ser grupos  $\text{PO}_4^{3-}$  próximos a vacantes  $\text{Ca}^{2+}$  u  $\text{OH}^-$  o iones  $\text{HPO}_4^{2-}$ ). (Poca variación de desplazamiento)

El polvo con una relación  $\text{Ca/P}=1,67$ , experimento 3 en la tabla 5.3, presenta dos picos con un desplazamiento químico centrado a  $\approx 2,64$  ppm y 5,28 ppm respectivamente ( $Q^\circ$ ). El primer pico, que corresponde al 97% del P, con una anchura de 1.06 ppm se atribuye a una apatita con una mayor cristalinidad que la formada en el polvo con  $\text{Ca/P}=1,5$ . Esta diferencia se atribuye al mayor tiempo de envejecimiento del precipitado en esta síntesis, Tabla 5.3.<sup>(11)</sup> El pico a 5,28 ppm, que corresponde a  $\approx 3\%$  del P, con una anchura de 3,14 ppm se atribuye a grupos ortofosfato en un entorno químico diferente (pequeñas inhomogeneidades en el material).

Los cambios en la anchura de pico de las diferentes muestras se asocian a cambios en la cristalinidad del polvo (a mayor cristalinidad menor anchura), Tabla 5.10.<sup>(11, 24, 25)</sup>

De los resultados del análisis químico, mineralógico y estructural realizado a los fosfatos obtenidos, se concluye que cuando los tiempos de mezclado y envejecimiento son mínimos el producto tiene una relación de  $\text{Ca/P} = 1,50$  y una estructura apatítica con un nivel de cristalinidad muy bajo; mientras que a tiempos más largos de estas etapas el producto tiende hacia valores de  $\text{Ca/P}=1,67$  cuando la relación  $\text{Ca/P}$  inicial es  $\geq 1,50$ , y hacia valores próximos a 1,07 cuando el valor inicial es  $< 1,50$ . El valor de  $\text{Ca/P}=1,67$  corresponde con el de la HAp, mientras que el valor de 1,07 se aproxima al del fosfato dicálcico ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ,  $\text{C}_2\text{P}$ ).

De lo expuesto parece que tiempos de envejecimiento cortos originan polvos con un tamaño de grano ligeramente mayor (formación de aglomerados), como se deduce de la comparación del diámetro aparente,  $D_{\text{BET}}$ , calculado con la ecuación 5.6 (entre 0,1 y 0,5  $\mu\text{m}$ ), y el tamaño de partícula estimado con espectroscopia laser (entre 5 y 71  $\mu\text{m}$ ). Tiempos de envejecimiento cortos hacen que el precipitado retenga una cantidad significativa de agua, 8,6% en peso, la cual actúa como aglomerante durante la etapa de tamizado realizada antes del proceso de calcinación, obteniéndose un aumento considerable del tamaño de partícula después de la calcinación (71  $\mu\text{m}$  frente al 5-10  $\mu\text{m}$  de las muestras con tiempo de envejecimiento largo). El contenido de agua en esta muestra puede hacer necesaria una calcinación previa al proceso de sinterización.

**Tabla 5.3.** Características físico-químicas de los fosfatos de calcio apatíticos (ap-CaP) sintetizados por vía húmeda y calcinadas a 800°C.

Experimento	Ca/P molar teórica	Velocidad de mezclado (mL/h)	Tiempo maduración	Ca/P molar producto <sup>§</sup>	Tamaño de partícula (d <sub>50</sub> )	Superficie específica (cm <sup>2</sup> /g)	Densidad* (g/cm <sup>3</sup> )	D <sub>BET</sub> <sup>**</sup> (μm)	ΔP hasta 1300°C (%)
1	1,48	200	12 h	1,07	9,8	5,0	2,97	0,4	0,4
2	1,51	200	12 h	1,69	4,1	17,2	3,14	0,1	n.d.
3	1,50	200	12 h	1,67	5,6	11,3	3,02	0,2	n.d.
4	1,50	Premezcla	5 min	1,50	71,2	4,1	3,06	0,5	8,6

<sup>§</sup> Resultados del análisis químico realizado por Fluorescencia de rayos X (FRX). \*Densidad obtenida mediante picnometría de He.

<sup>\*\*</sup> D<sub>BET</sub> es el tamaño de partícula equivalente (μm), calculado mediante  $D_{BET} = 6/p \times S$ , donde p es la densidad del sólido (g·cm<sup>3</sup>), y S es la superficie específica medida utilizando el método BET (m<sup>2</sup>·g).

### 5.2.2.2 Comportamiento térmico de los productos obtenidos

#### - Tratamientos no- isotérmicos

En la Figura 5.7 se muestran las curvas obtenidas mediante ATD-TG de los productos obtenidos con Ca/P = 1,50, 1,67 y 1,07. En la Tabla 5.4 se resumen las pérdidas de peso determinadas para cada producto. El comportamiento térmico de las tres muestras es muy diferente como era de prever por las grandes diferencias en la relación Ca/P establecidas por el análisis químico.

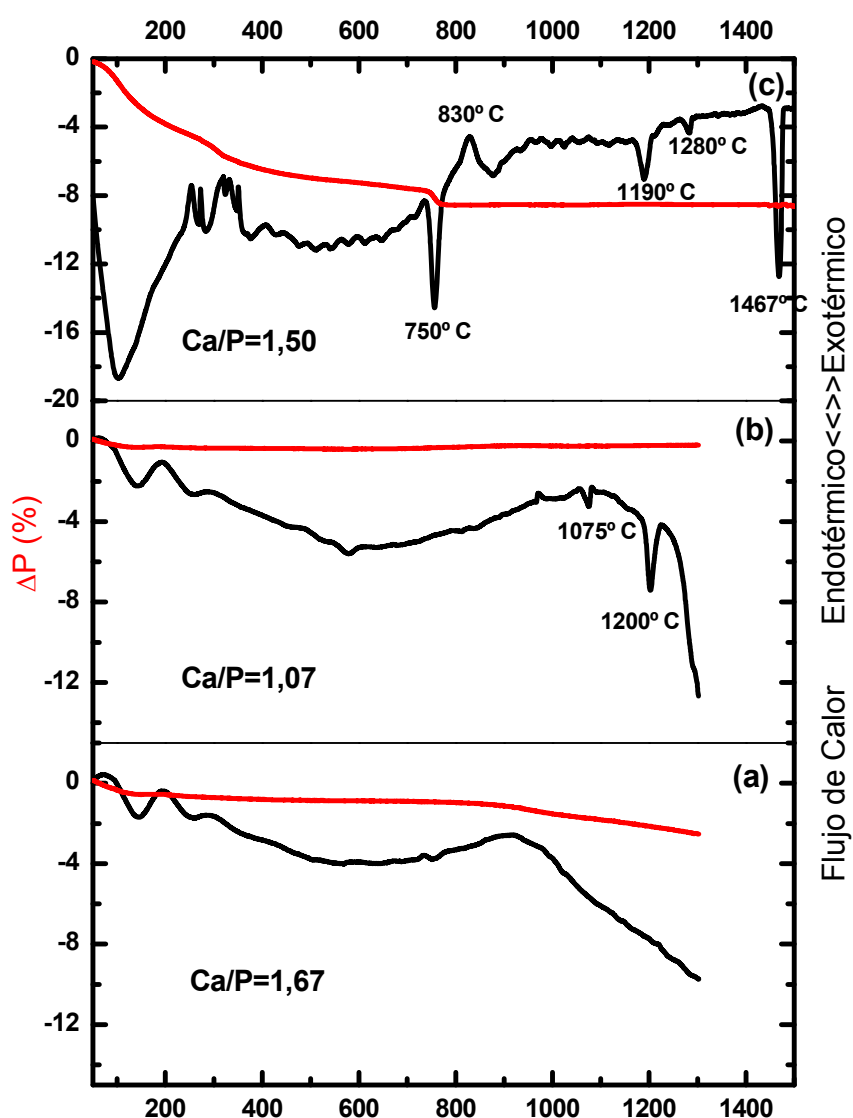
**Tabla 5.4.** Resultados de pérdida de agua (%) según el TG de los diferentes ap-CaP

Rango de Temperatura (°C)	Reacción de evolución de agua	Pérdida de masa respecto de la masa final (%)		
		Ca/P = 1,07	Ca/P = 1,50	Ca/P = 1,67
20-700	Reacciones {5.7} a {5.9}	0,4	7,6	0,9
700-800	Reacción {5.10}	0	1,0	0,0
800-1300	HAp → C <sub>3</sub> P + C <sub>4</sub> P + H <sub>2</sub> O	0	0	1,5
20-1300		0,4	8,6	2,4

**La composición con Ca/P=1,67** muestra una pérdida de peso menor al 1% hasta 750°C, Figura 5.7a, sin que se observe ningún pico endo -o exotérmico claramente definido. A partir de 750°C se observa una pérdida de peso continua y un significativo cambio de pendiente en la curva de ATD que podrían estar asociados a un aumento en la cristalinidad de HAp. Para confirmar esta hipótesis, los materiales obtenidos después de tratamientos térmicos de estos polvos a distintas temperaturas (800°, 1000° y 1300°C) se han caracterizado por DRX y espectroscopias Raman y RMN de <sup>31</sup>P. Los resultados obtenidos indican que esta composición da lugar a una hidroxiapatita pura hasta T≈1300°C lo que confirma la relación Ca/P = 1.67 establecida por FRX para los polvos obtenidos con una relación teórica inicial de Ca/P de 1,5 y una velocidad de mezclado de 200 mL/h y 12 h de maduración (ver resultados expuestos en los apartados siguientes).

La curva de TG de la **composición con Ca/P=1,07**, Figura 5.7b, no muestra pérdidas apreciables de peso en todo el rango de temperatura evaluado. La curva de ATD de esta composición presenta distintos picos endotérmicos que deben corresponder a las

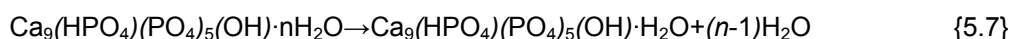
distintas transformaciones polimórficas de  $C_2P$  y  $C_3P$ . Para confirmar el mecanismo de reacción se trataron térmicamente polvos de esta composición a distintas temperaturas y los materiales obtenidos se han caracterizado por DRX. Los resultados obtenidos indican que esta composición a  $T > 800^\circ C$  da lugar a una mezcla de  $C_3P$  y  $C_2P$  lo que confirma la relación  $Ca/P = 1,07$  establecida por FRX para los polvos obtenidos con una relación teórica inicial de  $Ca/P$  de 1,48, con una velocidad de mezclado de 200 mL/h y 12 h de maduración (ver resultados expuestos en los apartados siguientes).



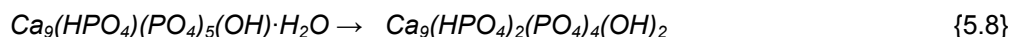
**Figura 5.7** ATD-TG de los productos con  $Ca/P$  1,67, 1,07 y 1,50.

En el análisis térmico diferencial de la **composición con una relación Ca/P=1,50**, Figura 5.7c, se observa una pérdida de peso de  $\approx 7,6\%$  hasta  $700^{\circ}\text{C}$  asociada a distintos picos endotérmicos que se atribuyen a la eliminación de residuos de síntesis. Estas pérdidas de peso, se pueden explicar teniendo en cuenta el mecanismo propuesto por Mortier et al<sup>(26)</sup> para hidroxiapatitas deficientes en calcio ( $\text{Ca}_{10-z}(\text{HPO}_4)_z(\text{PO}_4)_{6-z}(\text{OH})_{2-z}\cdot n\text{H}_2\text{O}$ ), donde  $z$  para el caso de  $\text{Ca/P}=1,5$  es igual a 1, a reacciones del tipo:

1. Pérdida de agua absorbida ( $T < 200^{\circ}\text{C}$ ),



2. Evolución del agua de cristalización ( $200-800^{\circ}\text{C}$ )



El DRX de la muestras calcinadas a  $800^{\circ}\text{C}$  y  $1100^{\circ}\text{C}$ , Figura 5.10, indica que la única fase cristalina en este intervalo de temperatura es el  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ .

El pico endotérmico que comienza a  $\approx 1150^{\circ}$  y con máximo a  $1190^{\circ}\text{C}$  se asocia a la transformación de  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  a  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$  (se confirma con el análisis por DRX sobre la muestra calcinada a  $1300^{\circ}\text{C}$ , Figura 5.10).

El pico endotérmico a  $1283^{\circ}\text{C}$  se atribuye a la presencia de muy pequeñas cantidades de  $\text{C}_2\text{P}$  ( $<1\%$ ) no detectadas por DRX pero que se han podido formar por la evolución de la apatita deficiente en calcio descrita en el apartado anterior. Según Destainville<sup>(13)</sup> el ATD es sensible a cantidades de hasta  $0,5\%$  en peso de  $\text{C}_2\text{P}$  en mezclas bifásicas  $\text{C}_3\text{P}\text{-C}_2\text{P}$ .

Por último el pico endotérmico con máximo a  $1468^{\circ}\text{C}$  se debe a la transformación reversible de  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$  en  $\alpha'\text{-C}_3\text{P}$ .

### - Tratamientos isotérmicos

Teniendo en cuenta los resultados del ATD-TG de las tres composiciones estudiadas se han calcinado los polvos (obtenidos después del secado a 70°C) a diferentes temperaturas (durante 4 horas y a una velocidad de calentamiento de 5°C/min y velocidad de enfriamiento de 10°C/min). Las diferentes temperaturas se han elegido para obtener polvos de  $\beta$  y  $\alpha$   $C_3P$  puro.

Así mismo, se han realizado tratamientos a temperaturas seleccionadas para establecer las temperaturas de transformación de los distintos polimorfos del  $C_3P$  y  $C_2P$  para las distintas composiciones estudiadas. Los polvos obtenidos se han caracterizado desde el punto de vista estructural por DRX y cuando se ha considerado necesario mediante espectroscopias Raman y de RMN de  $^{31}P$ .

#### 5.2.2.3 Caracterización estructural

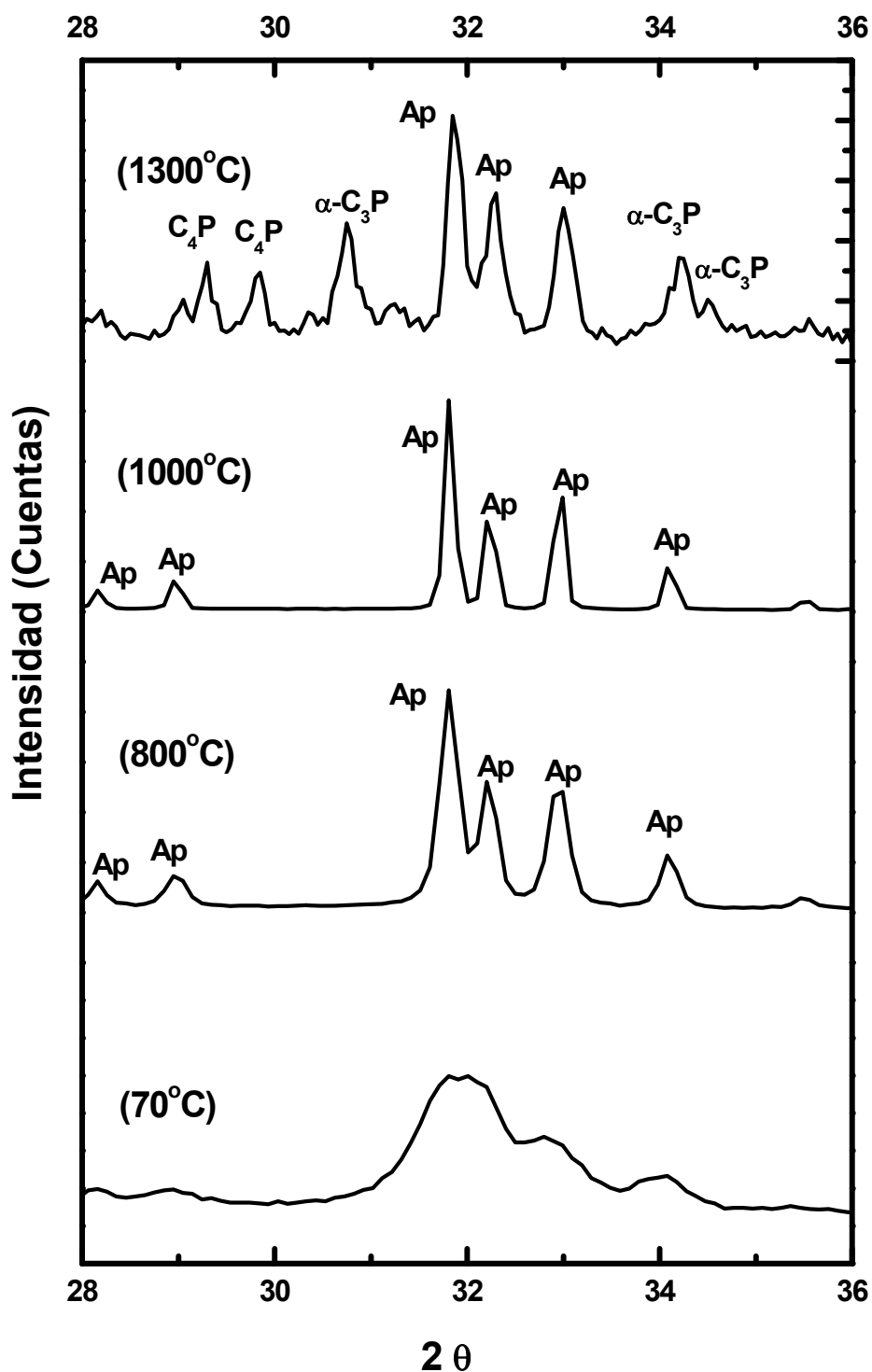
##### - Difracción de Rayos X

El análisis cualitativo de las fases cristalinas formadas en las distintas muestras después del secado a 70°C y de la calcinación a diferentes temperaturas se ha realizado con difracción de rayos X de polvo. Los difractogramas obtenidos se presentan en las Figuras 5.8 a 5.10. Para cada uno de los materiales se ha incluido el difractograma del polvo después del proceso de envejecimiento y secado a 70°C.

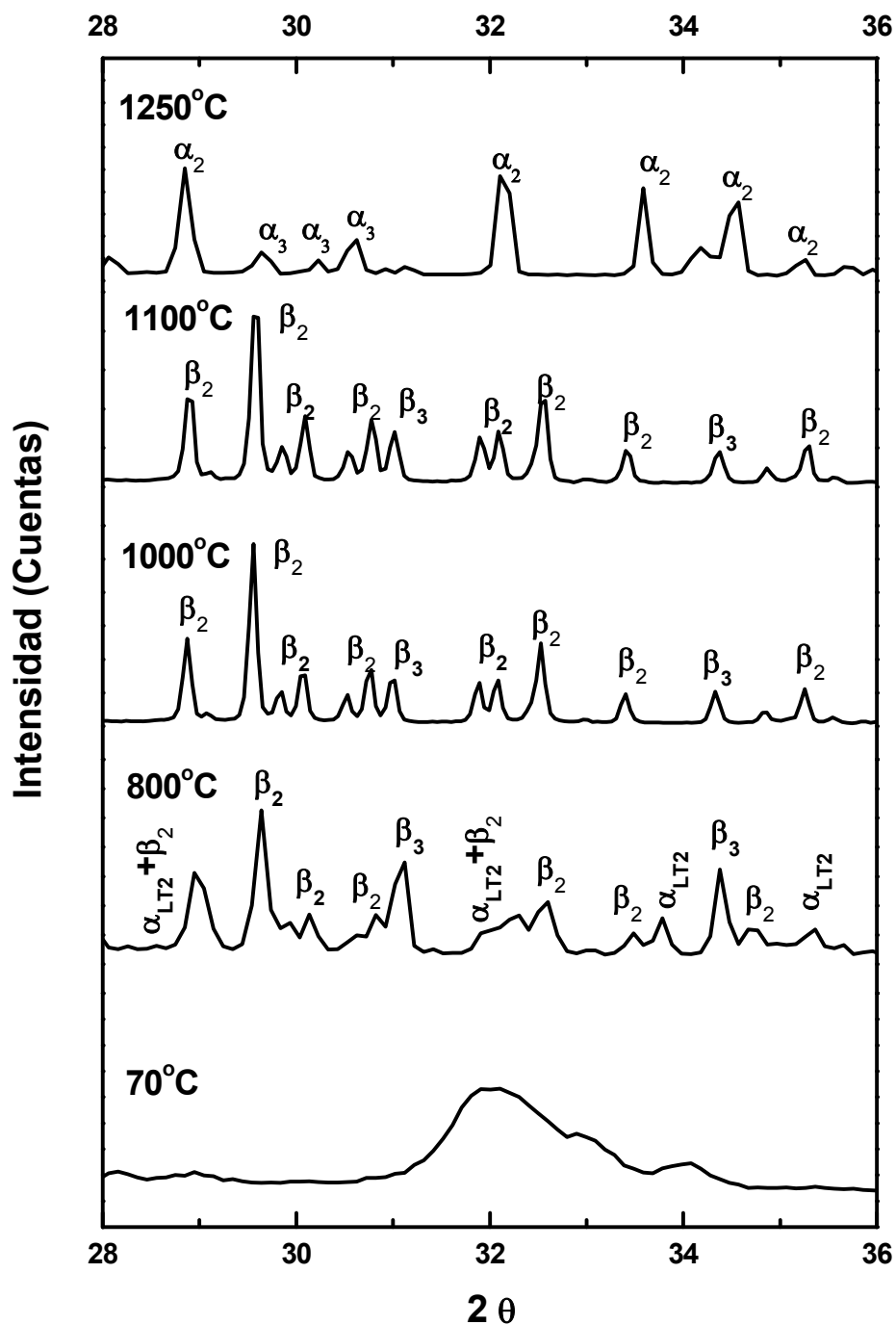
El producto con  $Ca/P=1,67$  calcinado a 1000°C presenta un difractograma con HAp como única fase cristalina, mientras que en el de la muestra calcinada a 1300°C se ha identificado la presencia de  $C_4P$  [ $C_4(PO_4)_2O$ ],  $\alpha$ - $C_3P$  e HAp. Figura 5.8.

En el producto con  $Ca/P = 1,07$  calcinado a 800°C por difracción de rayos X se identificaron  $\beta$ - $C_3P$ ,  $\alpha_{LT}$ - $C_2P$  y  $\beta$ - $C_2P$  ( $Ca_2P_2O_7$ ). En las muestras obtenidas por calcinación a 1000°C y 1100°C solo están presentes las fases  $\beta$ - $C_3P$  y  $\beta$ - $C_2P$ , mientras que en la calcinada a 1250°C se identificó la presencia de  $\alpha$ - $C_3P$  y  $\alpha$ - $C_2P$ . Figura 5.9.

En el producto con  $Ca/P=1,50$ , fue detectada la fase  $\beta$ - $C_3P$  hasta 1100°C, mientras que a 1300°C se identifica únicamente la fase  $\alpha$ - $C_3P$ . Figura 5.10.

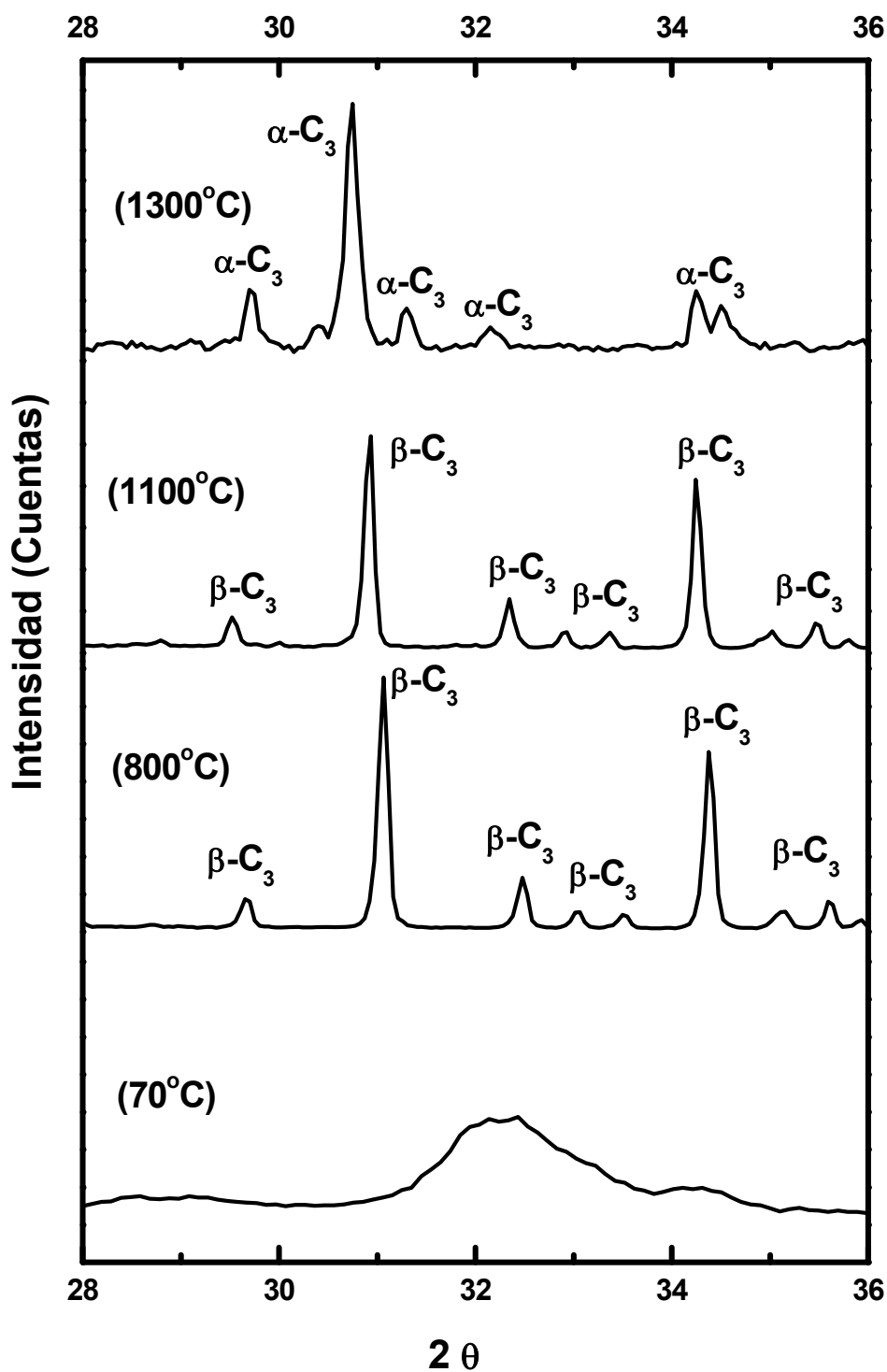


**Figura 5.8** Difractogramas de rayos X de muestras de productos con Ca/P = 1,67 (a) sin calcinar y calcinados a 800°C, 1000°C y 1300°C.  $\alpha_3$ :  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P (PDF 09-0169); C<sub>4</sub>: C<sub>4</sub>P (PDF 25-1137 ); Ap : Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>OH (PDF 09-0432).



**Figura 5.9** Difractogramas de rayos X de muestras de productos con Ca/P =1,07 sin calcinar y calcinados a 800°C, 1000°C y 1300°C.  $\beta_3$ :  $\beta$ -C<sub>3</sub>P (PDF 09-0169);  $\alpha_3$ :  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P (PDF 09-0348);  $\alpha_{LT2}$  y  $\alpha_2$ :  $\alpha_{LT}$ -C<sub>2</sub>P y  $\alpha$ -C<sub>2</sub>P (PDF 09-0345);  $\beta_2$ :  $\beta$ -C<sub>2</sub>P (PDF 09-0346); Ap: Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>OH (PDF 09-0432).





**Figura 5.10** Difractogramas de rayos X de muestras de productos con Ca/P =1,50 sin calcinar y calcinados a 800°C, 1000°C y 1300°C.  $\beta_3$ :  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF 09-0169);  $\alpha_3$ :  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF 09-0348).

## - Espectroscopía Raman

En la Figura 5.11 se presentan los espectros Raman de muestras en las que por DRX se identifica una única fase cristalina:  $\beta$ -C<sub>3</sub>P (obtenido por calcinación del polvo con relación Ca/P=1,50 a 800°C/4h),  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P (obtenido por calcinación del polvo con relación Ca/P=1,50 a 1300°C) y HAp (obtenida por calcinación del polvo con relación Ca/P=1,67 a 800°C). En las Tablas 5.6 a 5.8 se hace un resumen de los picos observados en el espectro Raman de los tres fosfatos monofásicos obtenidos y se comparan con trabajos publicados anteriormente por de Aza y col.<sup>(27)</sup>, Sanjeevi Kannan y col.<sup>(28)</sup> y Jillavenkatesa y col.<sup>(29)</sup> para el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P,  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P y la HAp.

Los modos de vibración normales de los tetraedros libres de fosfatos son bien conocidos, y dan lugar a 4 diferentes frecuencias<sup>(27)</sup>. La frecuencia  $\nu_1$  corresponde a la tensión simétrica de los enlaces P-O (simetría A<sub>1</sub>), la frecuencia  $\nu_2$  corresponde al modo de flexión O-P-O (simetría E), la frecuencia  $\nu_3$  surge del modo T<sub>2</sub> triplemente degenerado que involucra tensión asimétrica P-O y desplazamiento de P y la frecuencia  $\nu_4$  es debida al modo en flexión T<sub>2</sub> triplemente degenerado. Los valores de la frecuencia normal obtenidos con medidas de dispersión Raman sobre fosfatos en solución acuosa son 938 cm<sup>-1</sup> para  $\nu_1$ ; 420 cm<sup>-1</sup> para  $\nu_2$ ; 1017 cm<sup>-1</sup> para  $\nu_3$  y 567 cm<sup>-1</sup> para  $\nu_4$ , estos valores están dibujados por líneas punteadas en la Figura 5.11.

En fases cristalinas tales como el HAp, el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P y el  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P, los campos cristalinos inducen distorsiones en los tetraedros PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, los cuales cambian los ángulos y las distancias y conllevan a desplazamientos y desdoblamientos de los modos normales del PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. En consecuencia, las bandas internas de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> dependen de la estructura cristalográfica de cada compuesto.

Los espectros Raman de la figura 5.11 muestran que los 3 materiales presentan cuatro bandas de dispersión Raman que dominan claramente el espectro y que pueden ser directamente relacionados con las cuatro frecuencias del modo normal de los tetraedros PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> mencionados anteriormente.

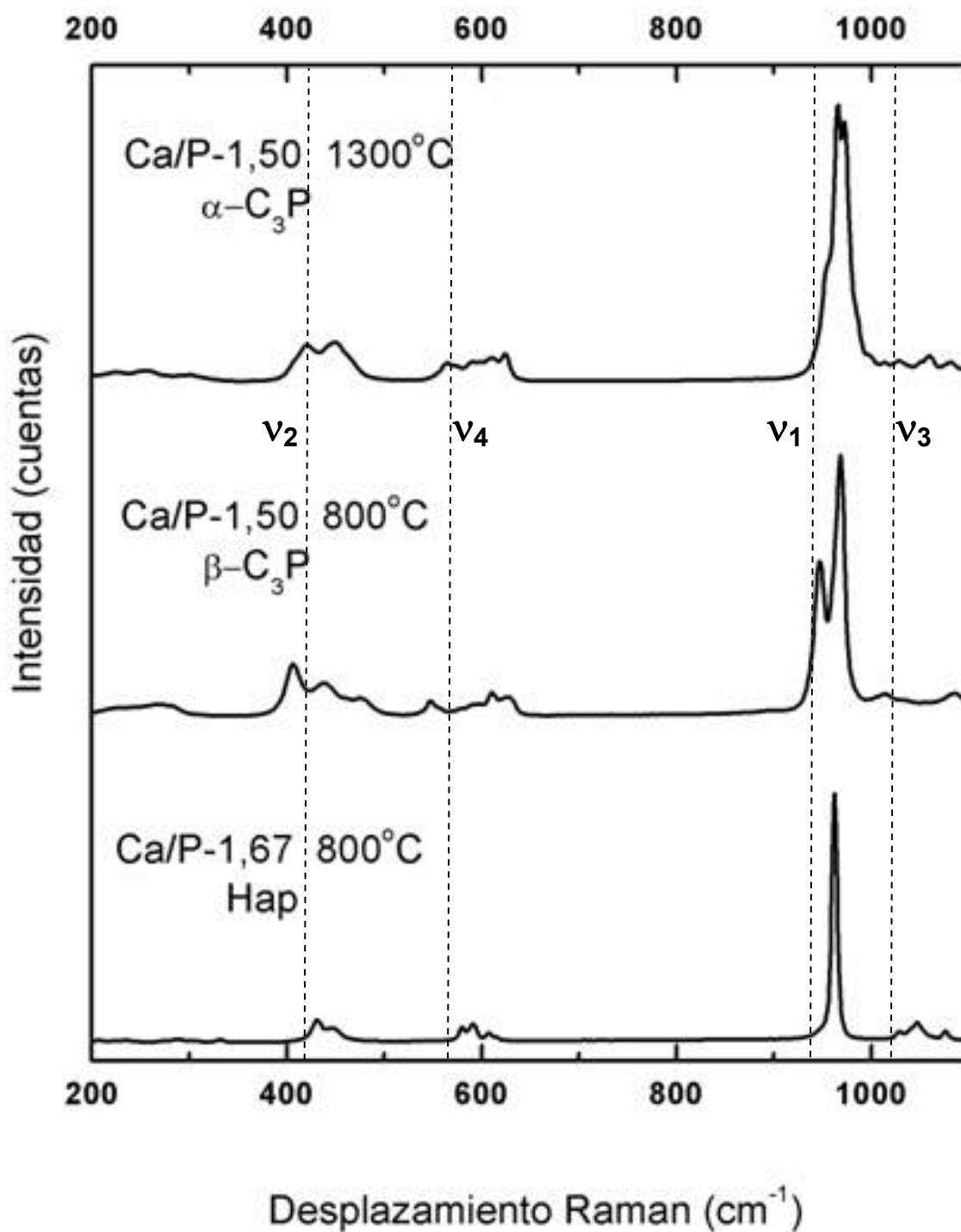
En los espectros se puede observar que los picos de mayor intensidad corresponden con la banda de frecuencia  $\nu_1$ ; en la HAp aparece un pico único a 962 cm<sup>-1</sup>, en el  $\beta$ -

C<sub>3</sub>P hay dos picos a 947 y 968 cm<sup>-1</sup> y en el α-C<sub>3</sub>P aparecen tres picos a 956, 964 y 972 cm<sup>-1</sup>. En los tres materiales se observan varios picos en las bandas originadas por las frecuencias doblemente degeneradas  $\nu_2$  y triplemente degeneradas  $\nu_3$  y  $\nu_4$ , sin embargo hay amplias diferencias entre los anchos de banda de los tres materiales, especialmente en las de  $\nu_2$  y  $\nu_4$ . La HAp tiene un ancho de 60 y 50 cm<sup>-1</sup>, el β-C<sub>3</sub>P de 140 y 105 cm<sup>-1</sup> y el α-C<sub>3</sub>P de 95 y 85 cm<sup>-1</sup> para las bandas de  $\nu_2$  y  $\nu_4$  respectivamente. Las bandas en los tres materiales están centradas a frecuencias entre 20 y 35 cm<sup>-1</sup> más altas respecto a los modos normales de los tetraedros libres (Tablas 5.6 a 5.8). Los grupos OH<sup>-</sup> presentes en la HAp se reflejan en la banda de translación OH<sup>-</sup> a 331 cm<sup>-1</sup>. Las bandas de tensión de los grupos OH<sup>-</sup> que deberían salir a 3572 cm<sup>-1</sup> no se registran en el modo de análisis utilizado.

El desplazamiento de las bandas en los tres materiales es similar, lo que indica un campo cristalino igualmente fuerte en las tres estructuras. Sin embargo, las tres estructuras son considerablemente diferentes, el β-C<sub>3</sub>P cristaliza en el grupo espacial R3c con 42 tetraedros PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y 3 sitios de fósforo cristalográficamente distintos. El compuesto α-C<sub>3</sub>P cristaliza en el grupo espacial P121/a1(14) con 48 tetraedros, y 12 sitios de fósforo cristalográficamente diferentes, en su celda unidad; mientras que la HAp lo hace en el grupo espacial P6<sub>3</sub>/m con sólo 6 tetraedros, todos equivalentes, en su celda unidad (Tabla 5.5). El grado de complejidad de las estructuras, como se ha discutido por de Aza y col<sup>(27)</sup> se encuentra reflejado en el número de picos observados para la frecuencia  $\nu_1$  ( un único pico para HAp, dos para β-C<sub>3</sub>P y tres para α-C<sub>3</sub>P), y la separación entre las frecuencias correspondientes a  $\nu_2$  y  $\nu_4$ , que en este trabajo han resultado ser ≈100 cm<sup>-1</sup> para HAp, ≈25 cm<sup>-1</sup> para β-C<sub>3</sub>P y ≈65 cm<sup>-1</sup> para α-C<sub>3</sub>P.

**Tabla 5.5.** Datos estructurales de la HAp, del β-C<sub>3</sub>P y del α-C<sub>3</sub>P.

Propiedad	β-C <sub>3</sub> P <sup>(30)</sup>	α-C <sub>3</sub> P <sup>(31)</sup>	HAp <sup>(32)</sup>
Simetría	Romboédrica	Monoclínica	Hexagonal
Grupo espacial	R3c	P121/a1	P6 <sub>3</sub> /m
a (Å)	10,4352(2)	12,887(2)	9,4239(1)
b(Å)	10,4352(2)	27,280(4)	9,4239(1)
c(Å)	37,4029(5)	15,219(2)	6,8841(1)
α °	90	90	90
b °	90	126,20(1)	120
γ °	120	90	90
Z	21	24	2
V (Å <sup>3</sup> )	3527,26	4317,53(5)	525,75
D <sub>th</sub> (g·cm <sup>-3</sup> )	3,066	2,866	3,16



**Figura 5.11.** Espectros Raman de las muestras de Ca/P-1,67 calcinado a 800°C, y Ca/P-1,50 calcinados a 800°C y a 1300°C. Las líneas punteadas corresponden a las frecuencias de las vibraciones de los modos normales de  $\text{PO}_4^{3-}$  medidas en solución acuosa.

**Tabla 5.6.** Vibraciones asociadas a los  $\text{PO}_4^{3-}$  en el  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  (muestra con  $\text{Ca/P}=1,5$  obtenida por calcinación a  $800^\circ\text{C}/4\text{h}$ ) comparadas con los publicados por de Aza et al<sup>(27)</sup> y Sanjeevi Kannan et al<sup>(28)</sup> para el  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ .

Producto	Fases según DRX	Tipo de vibraciones ( $\text{cm}^{-1}$ )			
		Tensión simétrica - flexión P-O, $\nu_1$	Tensión asimétrica, $\nu_2$	Tensión asimétrica P-O, $\nu_3$	Flexión O-P-O, $\nu_4$
Frecuencias de modo normal		938	420	1017	567
$\beta\text{-C}_3\text{P}$ según de de Aza, et.al	$\beta\text{-C}_3\text{P}$	949	405	1016	547
		970	439	1046	578
			475	1091	599
					611
					625
$\beta\text{-C}_3\text{P}$ según Sanjeevi Kannan et al.	$\beta\text{-C}_3\text{P}$	949	405	1016	545
		970	437	1046	611
			475	1090	
Ca/P-1,50 800°C	$\beta\text{-C}_3\text{P}$	947	406	1014	547
		968	437	1054	580
			475	1085	599
					611
					625

**Tabla 5.7.** Vibraciones asociadas a los  $\text{PO}_4^{3-}$  en el  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$ , muestra con  $\text{Ca/P}=1,5$  obtenida por calcinación a  $1300^\circ\text{C}/4\text{h}$ , comparadas con los publicados por Jillavenkatesa, et al<sup>(29)</sup>.

Producto	Fases según DRX	Tipo de vibraciones			
		Tensión simétrica - flexión P-O, $\nu_1$	Tensión asimétrica, $\nu_2$	Tensión asimétrica P-O, $\nu_3$	Flexión O-P-O, $\nu_4$
Frecuencias de modo normal		938	420	1017	567
$\alpha\text{-C}_3\text{P}$ según Jillavenkatesa, et.al	$\alpha\text{-C}_3\text{P}$	954	n.d.	984 1025 1055	551 563 585 597 613
Ca/P-1,50 1300°C	$\alpha\text{-C}_3\text{P}$	956 964 972	422 449	995-1120	564 573 591 612 623

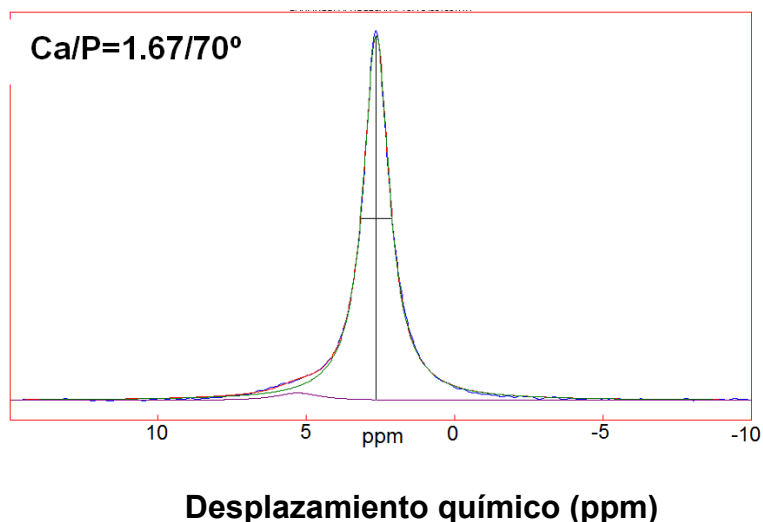
**Tabla 5.8.** Resumen de las vibraciones asociadas a los  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{OH}^-$  en la Hidroxiapatita (muestra con Ca/P-1,67 calcinada a 800°C) y los publicados por de Aza et. al.<sup>(27)</sup>.

Producto	OH-		Tipo de vibraciones $\text{PO}_4^{3-}$			
	tensión	Lib	Tensión simétrica – P-O, $\nu_1$	Tensión asimétrica, O-P-O, $\nu_2$	Tensión asimétrica P-O, $\nu_3$	Flexión O-P-O, $\nu_4$
Frecuencias de modo normal			938	420	1017	567
HAp según De Aza et.al. <sup>25</sup>			962	430	1029	579
				447	1033	588
				452	1043	591
					1048	594
					1054	607
					1077	615
Ca/P-1,67 800°C	332		962	431	1029	580
				447	1047	592
					1076	607
						614

- **Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear.**

**RMN  $^{31}\text{P}$ .** Se han registrado los espectros de RMN-RAM de  $^{31}\text{P}$  de muestras monofásicas (aquellas que mediante DRX mostraban una única fase cristalina):  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  (obtenido por calcinación del polvo con relación  $\text{Ca/P}=1,50$  a  $800^\circ\text{C}/4\text{h}$ ),  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$  (obtenido por calcinación del polvo con relación  $\text{Ca/P}=1,50$  a  $1300^\circ\text{C}$ ) y de la HAp (obtenida por calcinación del polvo con relación  $\text{Ca/P}=1,67$  a  $800^\circ\text{C}$ ).

El espectro de RMN-RAM  $^{31}\text{P}$  del polvo con  $\text{Ca/P}=1,67$  calcinado a  $800^\circ\text{C}$ , Figura 5.12, es similar al obtenido para los dos productos secados a  $70^\circ\text{C}$ , Figura 5.6, se observa un único pico con un desplazamiento químico centrado en  $\approx 2,62$  ppm que debe corresponder a hidroxiapatita. La estructura de la hidroxiapatita contiene un único tipo de fósforo en entornos de tipo  $\text{Q}_0$  (ver apéndice 3).



**Figura 5.12.** Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  de los polvos con  $\text{Ca/P}=1.67$ . Muestra obtenida por calcinación a  $800^\circ\text{C}/4\text{h}$ . Se incluyen los espectros experimentales, las componentes resueltas y el espectro suma de las componentes.

**Tabla 5.9.** Posiciones atómicas de Ca y P en la estructura cristalina de la HAp.

Átomo	Sitio	oxidación	Biso/ $\text{\AA}^2$	Nivel de Ocupación
Ca1	(4f)	2	0.29(2)	1
Ca2	(6h)	2	0.29(2)	$\frac{1}{2}$
P1	(6h)	5	0.38(3)	$\frac{1}{2}$



**Tabla 5.10.** Análisis por RMN de  $^{31}\text{P}$  de los fosfatos de calcio apatíticos y de la HAp obtenidos en esta tesis y comparación con otros trabajos. s.d. sin datos.

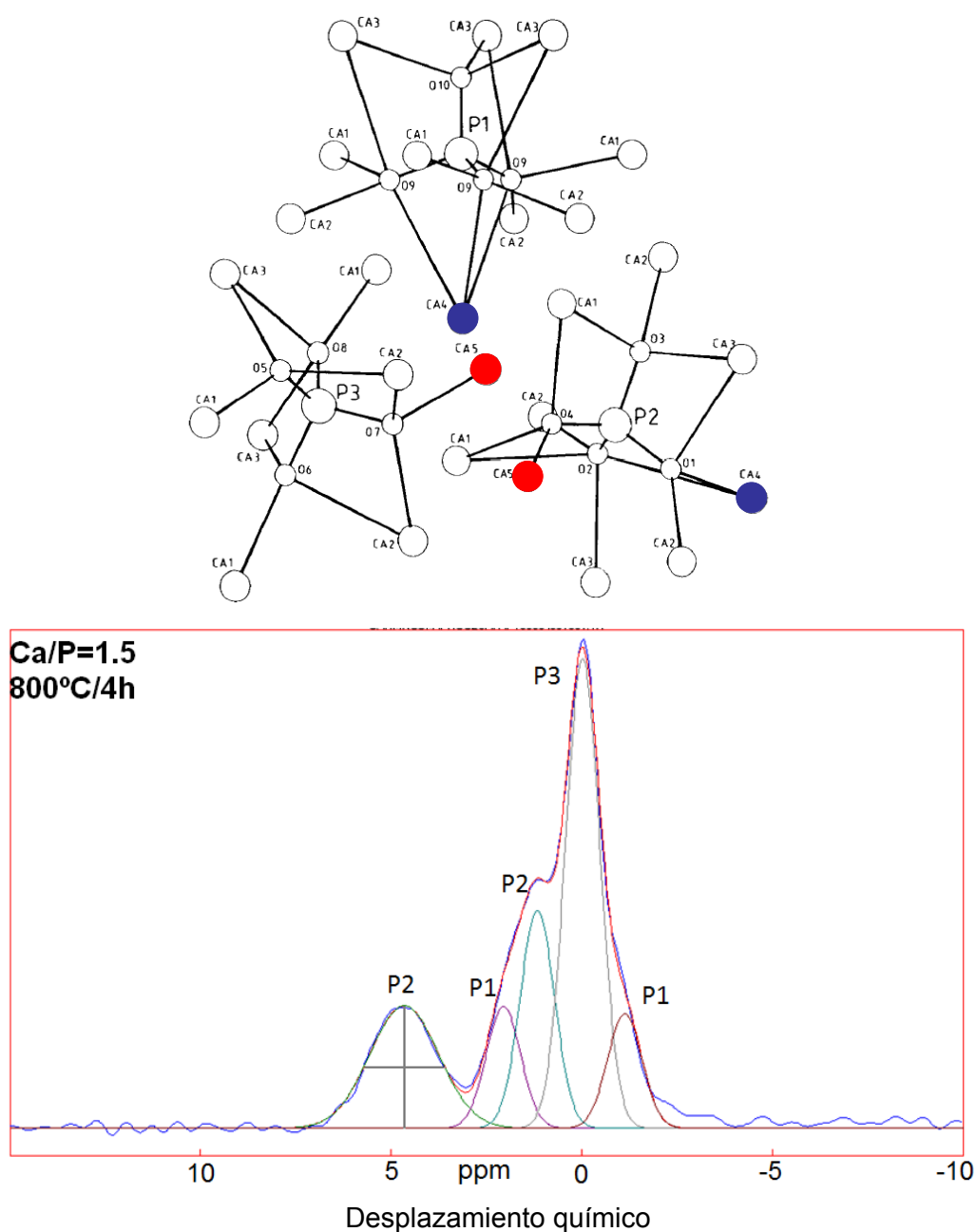
	$\delta_{\text{iso}}$ (ppm)	Anchura de pico
HAp Ref Belton, et al	2,3	s.d.
HAp Ref Rothweil W, P	2,8	s.d.
Ca/P=1,50 70°C	2,69	1,16 ppm
Ca/P=1,67 70°C	2,64	1,06 ppm
Ca/P=1,67 800°C	2,62	0,56 ppm

La muestra con Ca/P=1.5, calcinada a 800°C, está constituida únicamente por una única fase cristalina,  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ , según su difractograma y su espectro Raman.

El espectro de RMN de  $^{31}\text{P}$  del  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ , Figura 5.13, se compone de 5 resonancias isotrópicas con desplazamiento químico e intensidades diferentes<sup>(33,34)</sup>. Esto refleja la naturaleza compleja de la estructura del  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  en la cual existen 3 sitios de fósforo cristalográficamente distintos con niveles de ocupación 1:3:3 para los sitios P(1), P(2) y P(3) respectivamente<sup>(35)</sup>. Ver Tabla 5.11.

**Tabla 5.11.** Posiciones atómicas en la celdilla unidad del  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ . P-O=Distancia media del enlace fosforo-oxígeno.

	Índices de Wyckoff	Coordinación	Ocupación	P-O (Å)	Átomos totales celdilla unidad	(%)
Ca(1)	(18b)	7	1.0		18	27.27
Ca(2)	(18b)	8	1.0		18	27.27
Ca(3)	(18b)	8	1.0		18	27.27
Ca(4)	(6a)	3	0.5		3	4.55
Ca(5)	(6a)	6	1.0		6	9.09
VCa(4)			0.5			4.55
Total					63	100.00
P(1)	(6a)	4	1.0	1.517	6	14.28 (1)
P(2)	(18b)	4	1.0	1.535	18	42.85 (3)
P(3)	(18b)	4	1.0	1.535	18	42.85 (3)
					42	100.00



**Figura 5.13** a) Configuración de los P en la estructura del  $\beta$ - $\text{C}_3\text{P}$ ; b) Espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  del  $\beta$ - $\text{C}_3\text{P}$  (Ca/P = 1,50 calcinada a 800°C). Se incluye el espectro experimental, las cinco componentes resueltas y el espectro suma de las cinco componentes.

Según ha propuesto Jakeman et al.<sup>(33)</sup>, en el ajuste del espectro de la fase  $\beta$  se deben tener en cuenta 5 tipos de resonancias, debido a que los sitios P(1) y P(2) están conectados con sitios Ca(4) que están parcialmente ocupados; por lo que existirá una diferenciación en las señales de fósforo asociada a la ocupación o no de los sitios Ca(4) (Figura 5.13a y Tabla 5.11).

Teniendo en cuenta los niveles de ocupación del Ca y el P se pueden generar cinco resonancias isotrópicas, con intensidades relativas  $1 \times 1/2$  y  $1 \times 1/2$  para el P (1),  $3 \times 1/2$  y  $3 \times 1/2$  para el P (2) y 3 para el P (3) (con intensidades relativas: 7 y 7 para el P (1); 21,5 y 21,5 para el P(2) y 43 % para el sitio P(3)).

En la Figura 5.13b y en la Tabla 5.13 se puede observar el resultado de la desconvolución del espectro obtenido para el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P puro en cinco componentes individuales de tipo lorentziano: P(1) y P'(1) [11% y 7 % (esperado 7%)], P(2) y P'(2) [18% y 18% (esperado 21,5%)], P(3) [46% (esperado 43%)]. Las posiciones de las resonancias del espectro simulado y su semi-anchura se han obtenido de forma independiente para cada señal en el ajuste.

Se aprecia un muy buen acuerdo con la simulación realizada por Jakeman y col.<sup>(33)</sup> y por Obadia y col.<sup>(34)</sup> para  $\beta$ -C<sub>3</sub>P puro obtenido por métodos de síntesis diferentes. Así, Jakeman y col.<sup>(33)</sup> prepararon el C<sub>3</sub>P por disolución de cantidades estequiométricas de CaCO<sub>3</sub> y NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> en ácido nítrico diluido seguido de secado, molienda y calcinación a 800°C / 24 hr. Por otro lado Obadia y col.<sup>(34)</sup> obtienen el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P por reacción en estado sólido de la mezcla de CaHPO<sub>4</sub> (9,108 g) y CaCO<sub>3</sub> (3,336 g) molida durante 30 minutos y calentada a 1000 °C /24h.

Las pequeñas diferencias observadas en las intensidades del espectro se deben a indeterminaciones asociadas al proceso de ajuste, a diferencias en la cristalinidad de los fosfatos (asociadas al tiempo y temperatura de calcinación) o a la presencia de pequeñas cantidades en impurezas.

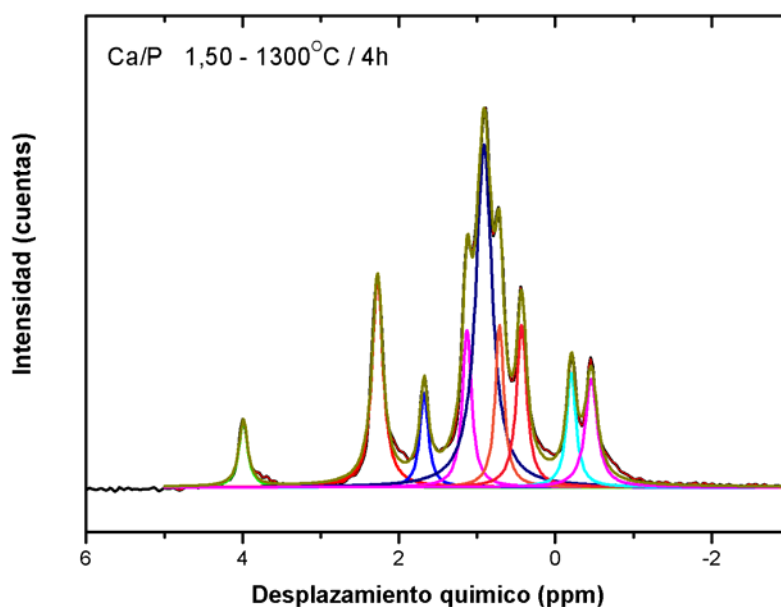
En la Tabla 5.12 se incluyen los datos correspondientes a las posiciones atómicas en la estructura cristalina del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P.

El espectro de RMN del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P, muestra calcinada a 1300°C/4h presenta un elevado número de componentes finos (entre 8 y 4 veces más finos que en el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P) detectadas en un rango espectral muy estrecho (4,5-2 ppm), lo que sugiere que el material presenta una elevada cristalinidad<sup>(36)</sup>. El espectro se ha descompuesto en 9 resonancias isotrópicas con desplazamiento químico e intensidades diferentes (Fig. 5.14 y Tabla 5.13). La estructura cristalina del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P tiene 12 sitios de fósforo cristalográficos diferentes, todos ellos con el mismo número de átomos, por lo que en principio se espera que el espectro RMN de <sup>31</sup>P tenga 12 picos de igual intensidad. El

espectro de la Figura 5.14, tiene un buen acuerdo con esta estructura si se considera que el pico con mayor intensidad (situado a un desplazamiento químico de 0,89 ppm) es el resultante de la suma de 3 picos y el pico en posición 2,25 ppm es el resultante de la suma de 2 picos. Las pequeñas diferencias observadas en las intensidades del espectro se deben a indeterminaciones asociadas al proceso de ajuste, a diferencias en la cristalinidad del fosfato (asociadas al tiempo y temperatura de calcinación) o a la presencia de pequeñas cantidades en impurezas.

**Tabla 5.12.** Posiciones atómicas de Ca y P en la celdilla unidad del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P.

Átomo	Wyckoff	Coordinación	Ocupación
Ca1,Ca2, Ca3,Ca5,Ca8,Ca12,Ca13,Ca15,Ca18	(4e)	7	1
Ca4,Ca6,Ca7,Ca9,Ca10,Ca14,Ca16	(4e)	6	1
Ca11, Ca17	(4e)	5	1
P1, ..., P12	(4e)	4	1



**Figura 5.14** Desconvolución del espectro de RMN  $^{31}\text{P}$  de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P (Ca/P =1,50 calcinada a 1300°C).

El perfil experimental del espectro del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P es similar al obtenido por Böhner y col.<sup>(36)</sup> aunque estos autores solo han resuelto 7 componentes (Tabla 5.13).

**Tabla 5.13.** Análisis de los resultados obtenidos por RMN de  $^{31}\text{P}$  de los distintos fosfatos con relación  $\text{Ca/P}=1.5$ .  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  y  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$

T (°C)	RMN $^{31}\text{P}$ experimental				Bibliografía	Fase por DRX
		$\delta_{\text{iso}}$ ppm	anchura ppm	%	Intensidad teórica	
800°C	P	2,65	0,57	100		Apatita
800°C	P2	4,72	1,93	18	21,5*	$\beta\text{-C}_3\text{P}$
	P1	1,95	1,06	11	7	
	P2'	1,15	1,06	18	21,5	
	P3	-0,03	1,06	46	43	
	P1'	-1,04	1,06	8	7	
1300°C	P1	3,97	0,14	3,85	4,2**	$\alpha\text{-C}_3\text{P}$
	P2,P3	2,25	0,17	14,22	2,5/++	
	P4	1,66	0,13	5,10	2	
	P5	1,11	0,14	8,77	1,4/++	
	P6,P7,P8	0,89	0,25	34,42	1/+++	
	P9	0,69	0,13	8,49	0,6/++	
	P10	0,41	0,15	10,25	0	
	P11	-0,22	0,14	6,63	-	
	P12	-0,48	0,19	8,27	-	

\* Valores de intensidad teóricos del  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ , teniendo en cuenta la estructura del  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  de Obadiay col.<sup>(34)</sup> y Jakeman et al.<sup>(33)</sup> \*\*Valores experimentales de  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$  de M. Bohner y col.<sup>(36)</sup>

### 5.2.3 Consideraciones finales a la síntesis por solución-precipitación

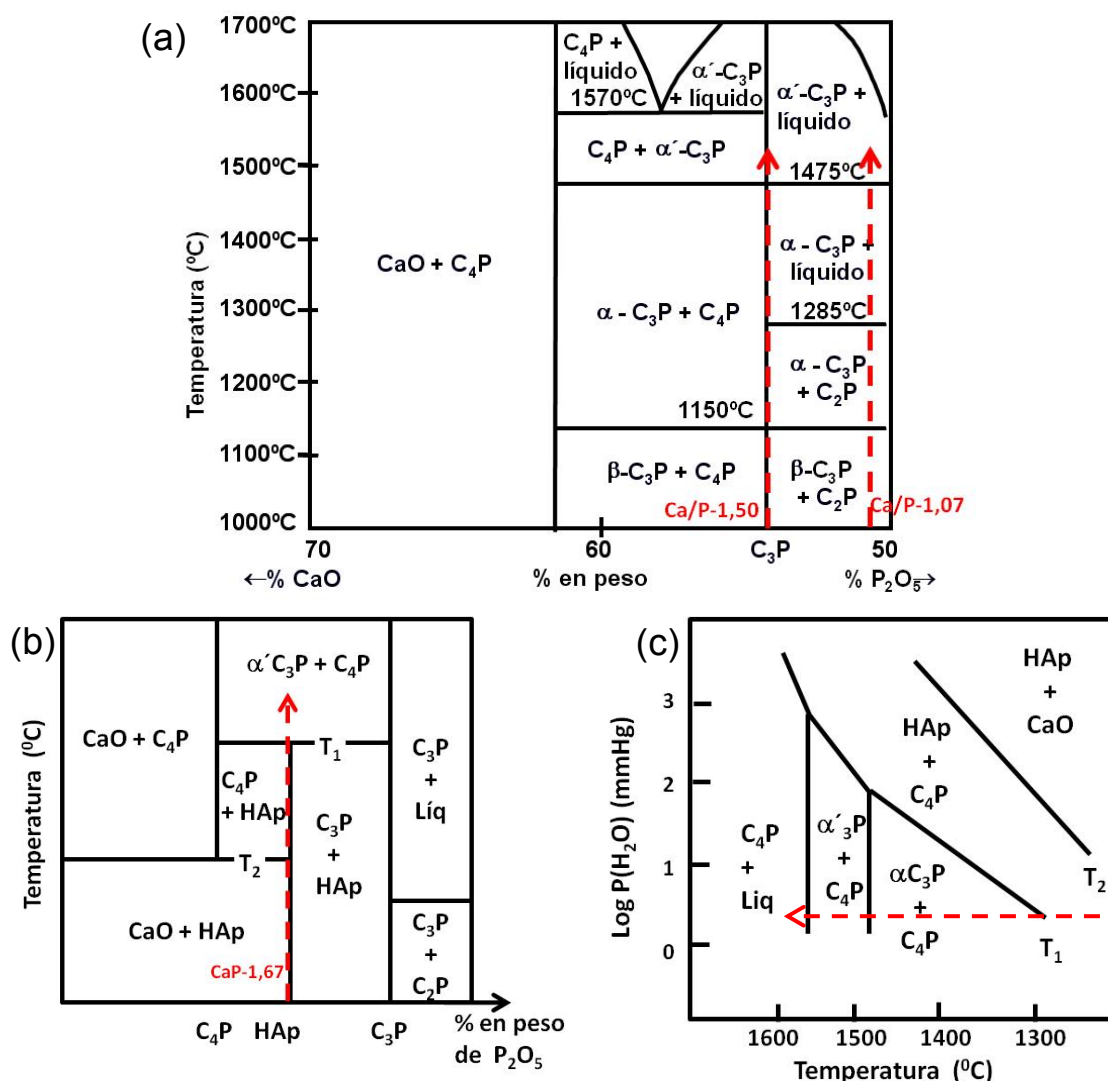
Las diferencias en los resultados del análisis químico de los fosfatos obtenidos con los distintos tipos de procesamiento indican que el método de mezclado y el tiempo de envejecimiento son parámetros cruciales en la síntesis de fosfato tricálcico.

Después del envejecimiento y secado a 70°C, los difractogramas de los tres fosfatos cálcicos apatíticos son muy similares, esta técnica no es capaz de diferenciar estos productos altamente amorfos y con diferentes relaciones Ca/P y contenidos de agua en esta etapa del proceso. El análisis termogravimétrico de los diferentes fosfatos de calcio apatíticos, ap-CaP's, pone en evidencia las diferencias observadas en el análisis químico. En la Tabla 5.4 se puede observar que en el rango hasta 700°C el polvo con Ca/P = 1,50 tiene una pérdida de agua considerablemente mayor a los otros dos productos, este comportamiento puede deberse al modo de procesamiento, específicamente al mínimo tiempo de mezclado y envejecimiento que impide el crecimiento del precipitado, más que un precipitado se obtiene un gel con gran cantidad de agua. En el caso de las apatitas cuyo procesamiento incluye un mayor tiempo de mezclado y envejecimiento tiene lugar un aumento en la cristalinidad del precipitado que retiene una menor cantidad de agua. Además, se observa que en el producto con Ca/P = 1,67 hay una pérdida apreciable de peso a  $T > 800^{\circ}\text{C}$ , que se puede relacionar a la pérdida del agua asociada a la cristalización de la HAp detectada en DRX.

Dada la gran pureza de los distintos fosfatos sintetizados, las fases detectadas en la muestra Ca/P=1,5 tratadas a elevadas temperaturas ( $T \geq 800^{\circ}\text{C}$ ) durante 2/4h coinciden con las esperadas si se tienen en cuenta el diagrama de equilibrio CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, Figura 5.15. Los difractogramas, el espectro Raman y RMN <sup>31</sup>P de las muestras calcinadas a 800°C y a 1300°C confirman que las estructuras estables a estas temperaturas son β-C<sub>3</sub>P y α-C<sub>3</sub>P respectivamente.

Para explicar los resultados obtenidos en la composición con Ca/P=1,67 hay que considerar el sistema CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-H<sub>2</sub>O y la presión parcial de agua. Así, el ATD de esta composición, Figura 5.7a, no presenta picos endo- o exotérmicos claramente definidos. Los difractogramas de rayos X y los espectros Raman y de RMN de <sup>31</sup>P, Figuras 5.8 a 5.12, confirman que hasta 1000°C la única fase estable es la HAp y no presenta ningún cambio de fase. La muestra secada a 70°C corresponde con una apatita poco cristalizada, el espectro de DRX presenta picos muy anchos y mal definidos que corresponden con los picos de la hidroxiapatita, mientras que las calcinadas a 800°C y 1000°C presentan los mismos picos bien definidos. En la muestra calcinada a 1300°C analizada por DRX se detecta además de HAp la presencia de C<sub>4</sub>P y α-C<sub>3</sub>P, lo que indica si se tiene en cuenta el diagrama de la Figura

5.15(b) y 5.15(c) que T1 es inferior a 1300°C y a su vez que la presión de vapor de agua durante el proceso de calcinación sería inferior a 3 mm de Hg (Figura 5.15 (c)).



**Figura 5.15.** Diagramas de equilibrio de fases CaO/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. (a) a presión de vapor 0 mm Hg, (b) ilustración simplificada para diversas presiones de vapor y (c) efecto de la presión parcial de agua sobre los campos de estabilidad de los fosfatos de calcio. Adaptación de Riboud et.al.<sup>(37)</sup> En la Figura se ubican las tres composiciones obtenidas.

Los resultados de la composición Ca/P=1,07 también se pueden explicar mediante el diagrama de la Figura 5.15a. Así, los difractogramas de las muestras calcinadas a temperaturas de 1000, 1100°C confirman que las estructuras estables son β-C<sub>3</sub>P y β-C<sub>2</sub>P, mientras que a 1250°C son α-C<sub>3</sub>P y α-C<sub>2</sub>P. Además, el DRX a 800°C muestra la presencia de la fase α metaestable de bata temperatura α<sub>LT</sub>-C<sub>2</sub>P.

Así pues, en las muestras con una relación  $\text{Ca/P} \geq 1,50$  se forman grupos ortofosfato y dan lugar a fosfatos tricálcicos o hidroxiapatita en función de la relación  $\text{Ca/P}$ , mientras que en la que tiene una relación  $\text{Ca/P} < 1,50$  se forman grupos pirofosfato y da lugar a mezclas de fosfato tricálcico ( $\text{C}_3\text{P}$ ) y ortofosfato ( $\text{C}_2\text{P}$ ).

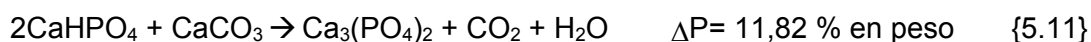
### 5.3 Síntesis de $\beta\text{-C}_3\text{P}$ por reacción en estado sólido de polvos activados mecánicamente. ( $\text{C}_3\text{P}$ puro y con adiciones de Mg- y Si)

#### 5.3.1 Procedimiento experimental

Los polvos de  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  necesarios para la fabricación de biocerámicas dopadas, se obtuvieron por reacción en estado sólido de mezclas estequiométricas de  $\text{CaCO}_3$  (26,892 % en peso) y  $\text{CaHPO}_4$  (72,107 % en peso) previamente activadas mecánicamente mediante molienda de atrición de alta energía.

La mezcla estequiométrica de  $\text{CaCO}_3$  y el  $\text{CaHPO}_4$  se ha molido, en atmosfera de aire, en un molino de atrición durante 45 minutos. Se han utilizado alcohol isopropílico y bolas de zircona parcialmente estabilizada (Y-PSZ) de 3mm de diámetro como medio de molienda. La velocidad de rotación fue de 1000 rpm, la relación bolas/polvo fue de 5/1 y la relación sólido/líquido fue de 2/3.

La mezcla obtenida se secó en una estufa a  $70^\circ\text{C}$  durante toda la noche, se deshizo la "torta" resultante en un mortero de ágata y el polvo así obtenido se pasó por un tamiz de  $100\ \mu\text{m}$  de luz de malla. La mezcla de polvo precursor se calcinó a  $1100^\circ\text{C}$  durante 4h en crisol de platino tapado (ecuación 5.11), se enfrió hasta temperatura ambiente, y se molió durante una hora en un molino de discos de carburo de tungsteno hasta un tamaño medio de partícula de  $2,3\ \mu\text{m}$ . La reacción ocurrida durante el tratamiento térmico fue la siguiente:



El polvo resultante fue caracterizado por difracción de rayos X (DRX) como  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  (PDF 09-169). Así mismo, se determinó su composición química mediante FRX. Los detalles de las técnicas experimentales se presentan en el capítulo 3.



Las composiciones de fosfato tricálcico con adiciones de Mg y Si se han formulado teniendo en cuenta la información suministrada por el diagrama de equilibrio pseudobinario  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  estudiado en el capítulo 4 de esta tesis (Figura 4.9). Se prepararon polvos con las composiciones C95, 95% en peso de fosfato tricálcico: 5% en peso de  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  y C90, 90% en peso fosfato tricálcico: 10 % en peso de  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ . Estas composiciones según el diagrama de equilibrio darán lugar a diferentes combinaciones de fases en función de la temperatura de tratamiento térmico en el rango de temperaturas 1100-1450°C. Para la composición C90 la temperatura de primera formación de fase líquida es  $1300\pm 5^\circ\text{C}$ , eutéctico del sistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ . La composición C95 está situada en el área de solución sólida del  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  cuyo punto invariante es  $1440\pm 10^\circ\text{C}$ .

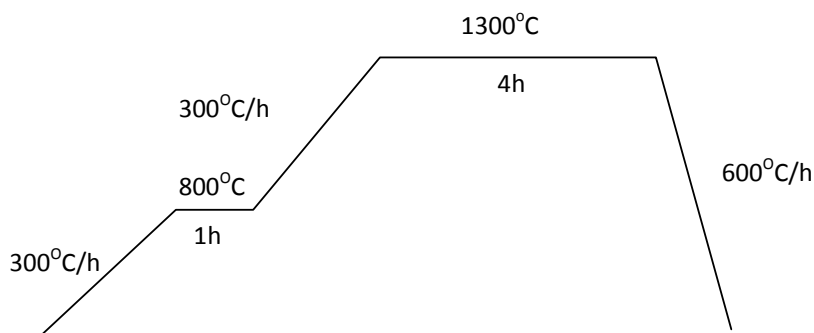
Para realizar el proceso de síntesis se prepararon mezclas estequiométricas del  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sintético obtenido previamente, según se describe en los párrafos anteriores, MgO,  $\text{CaCO}_3$  y sílice. Las mezclas se molieron, en atmosfera de aire, en un molino de atrición durante 60 minutos en las mismas condiciones de molienda que para la obtención del  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  puro descritas en el párrafo anterior.

Los polvos obtenidos, de las distintas composiciones preparadas, se han caracterizado por el método cromatográfico usando BET (área superficial específica), mediante un analizador de tamaño laser (distribución del tamaño de partícula) y mediante picnometría de He (densidad real).

Como se ilustra en la Figura 5.16, las dos mezclas de polvo se han calcinado a  $1100^\circ\text{C}$  durante 10h con un tratamiento intermedio para eliminar el  $\text{CO}_2$  en crisol de platino tapado, se han enfriado hasta temperatura ambiente, y se han molido en un molino de ágata y posteriormente en un molino de atrición durante una hora. Los polvos obtenidos se han caracterizado desde el punto de vista térmico mediante ATD y desde el punto de vista estructural por DRX, espectroscopias Raman y de RMN de  $^{31}\text{P}$  y  $^{29}\text{Si}$  cuando se ha considerado necesario.

### **5.3.2 Resultados**

En la Tabla 5.14 se presenta el análisis químico de los productos obtenidos. Se destaca la presencia de una pequeña impureza de MgO en el fosfato tricálcico sin adición de Si y Mg.



**Figura 5.16.** Tratamiento térmico realizado a los polvos de composición C95 y C90.

**Tabla 5.14.** Análisis químico mediante fluorescencia de rayos X de los productos obtenidos por sinterización en estado sólido.

	<b>C<sub>3</sub>P –e.s.</b>	<b>C95</b>	<b>C90</b>
CaO	52.9	52.8	51.4
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0.051	0.048	0.042
K <sub>2</sub> O	0.009	0.008	0.007
MgO	0.30	0.93	1.9
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	44.7	43.5	41.2
SiO <sub>2</sub>	0.10	2.8	5.5
TiO <sub>2</sub>	0.015	0.012	0.010
SrO	0.004	0.004	0.003
Na <sub>2</sub> O	0.10	0.09	0.08
Pérdida por calcinación	1.83		

La Tabla 5.15 muestra las características físicas de las materias primas, del C<sub>3</sub>P obtenido y de las mezclas C90 y C95 molidas.

El β-C<sub>3</sub>P, después de la calcinación y de una hora de molienda, tiene un tamaño de partícula relativamente pequeño con una distribución estrecha (0.4-4.6μm). Este producto es el componente mayoritario para la obtención de los compuestos C90 y C95 y es mucho más fino que los otros componentes, especialmente la calcita (15-46 μm) y la sílice amorfa (49-228 μm). Para asegurar que los componentes minoritarios estaban homogéneamente distribuidos se ha confirmado que después de la molienda los polvos tenían un tamaño de partícula similar al del componente con una granulometría más fina, C<sub>3</sub>P, como se muestra en la Tabla 5.15.

**Tabla 5.15.** Características físico-químicas de las materias primas y de los productos obtenidos despues de la molienda (1hora).

$D_{BET} = 6/\rho \times S$ .

	Características de los polvos						Calculado
	Distribución del tamaño de partícula				Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Se (m <sup>2</sup> ·g)	$D_{BET}$ (μm )
	d <sub>10</sub> (μm)	d <sub>50</sub> (μm)	d <sub>90</sub> (μm)	Aspecto de la curva granulométrica			
CaCO <sub>3</sub>	16	31	47	Unimodal	2,67	0,03	74,9
CaHPO <sub>4</sub>	2,8	6,0	45	Unimodal	2,92	2,2	0,93
MgO	3,3	7,3	15	Unimodal	3,20	29,5	0,06
SiO <sub>2</sub>	49	120	228	Unimodal	2,22	0,04	67,6
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (1h)	0,4	2,3	4,6	Bimodal	2,98	1,1	1,8
C95 (1h)	0,7	1,6	3,6	Unimodal	3,01	2,4	0,83
C90 (1h)	1,5	3,3	7,0	Bimodal	2,99	2,3	0,87

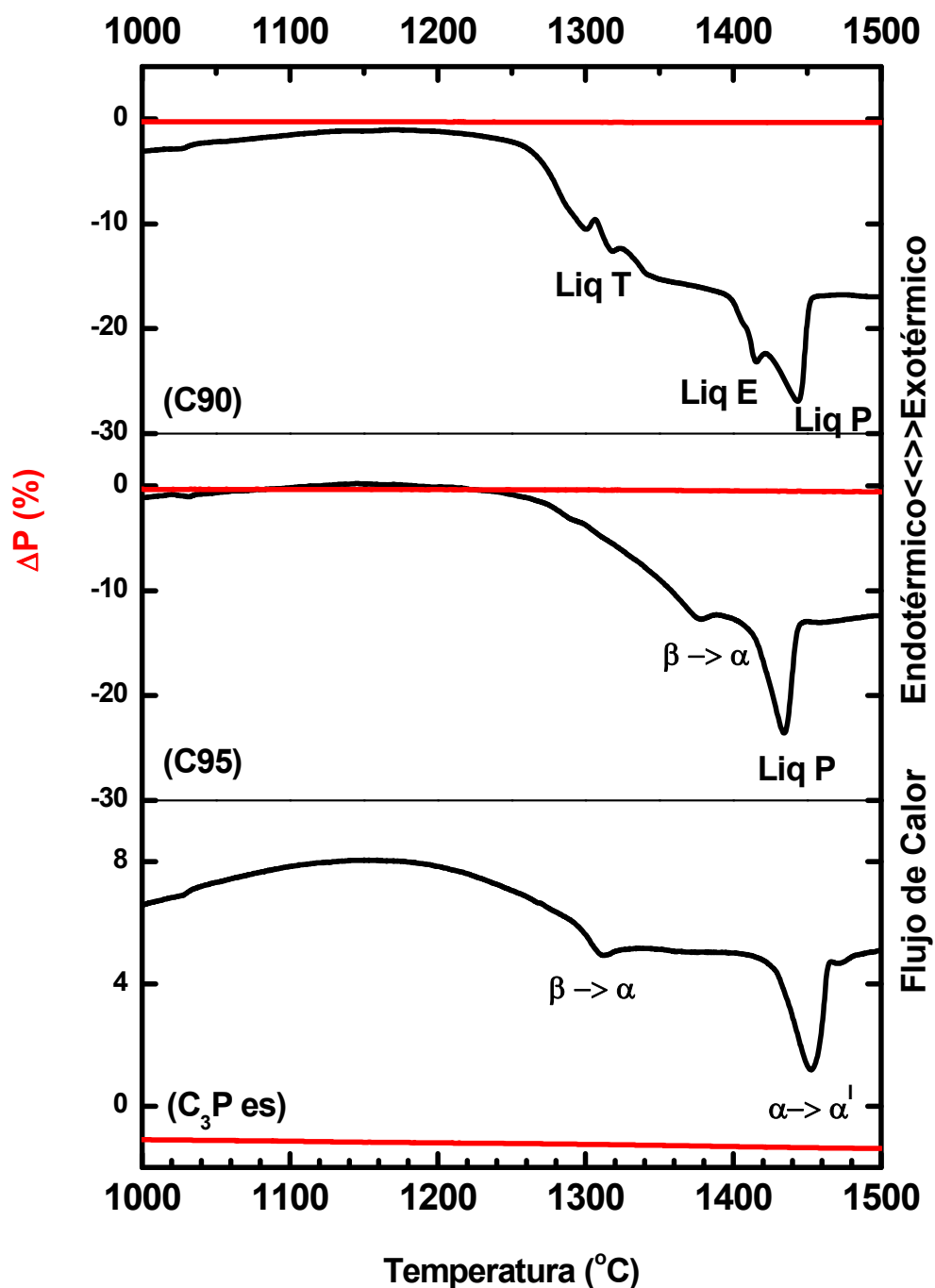
La mezcla C90 presenta parámetros de distribución de tamaño más grueso que la C95 pero ambas mezclas tienen superficies específicas similares, en consecuencia, puesto que las densidades son similares, el diámetro equivalente aparente,  $D_{BET}$ , también lo es, por tanto la diferencia en la distribución de tamaño puede deberse a la formación de aglomerados.

Los análisis térmicos diferenciales de las tres composiciones precalcinadas a 1100°C/10h se presentan en la Figura 5.17. En ella se puede observar como el pico endotérmico correspondiente a la transformación polimórfica  $\beta\text{-C}_3\text{P} \rightarrow \alpha\text{-C}_3\text{P}$  tiene lugar en las tres composiciones a temperaturas mucho más elevadas a la correspondiente al  $\text{C}_3\text{P}$  puro (1125 °C).

El análisis térmico diferencial del  $\text{C}_3\text{P}$  sin adiciones de Mg y Si obtenido por reacción en estado sólido muestra un pico endotérmico con máximo en 1300°C. El desplazamiento en la temperatura de la transformación polimórfica se atribuye a que las pequeñas impurezas de MgO en la muestra deben estar en solución sólida (0,3 % en peso) en el fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_{3-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_2$ ) (ver diagrama  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Ca}_3\text{Mg}_6(\text{PO}_4)_4$ )<sup>(38)</sup>. El Mg ocupa sitios de Ca de la red del  $\beta$ -fosfato tricálcico, debido a su menor radio iónico lo que estabiliza la fase  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ . El pico a 1440°C se atribuye a la transformación de  $\alpha\text{-} \rightarrow \alpha'\text{-C}_3\text{P}$ , la cual no está afectada por la presencia de Mg.

El análisis térmico diferencial de los fosfatos tricálcicos C90 y C95, presentan varios picos que se han atribuido a diferentes reacciones de acuerdo con el diagrama de equilibrio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 - \text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  mostrado en la Figura 4.9. En la muestra C95, el pico asociado a la transformación inicial  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  durante el calentamiento se observó a 1378°C, mientras el pico correspondiente a la formación de la fase líquida asociada con la reacción peritética  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{ss} \rightarrow \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{ss} + \text{Liq}$  se observó a  $\approx 1440^\circ\text{C}$ .

En la muestra C90, se han detectado varios picos que pueden ser atribuidos a la formación de fases líquidas transitorias (picos con máximos a  $\approx 1300^\circ\text{C}$  y  $1318^\circ\text{C}$ , temperaturas del eutéctico binario y de la línea de solidus para esta composición) y a fases líquidas estables (máximo a  $\approx 1415^\circ\text{C}$ , línea de subsolidus  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{Liq}$ ). Al igual que en C95, aparece el pico de la reacción peritética a  $\approx 1440^\circ\text{C}$ .



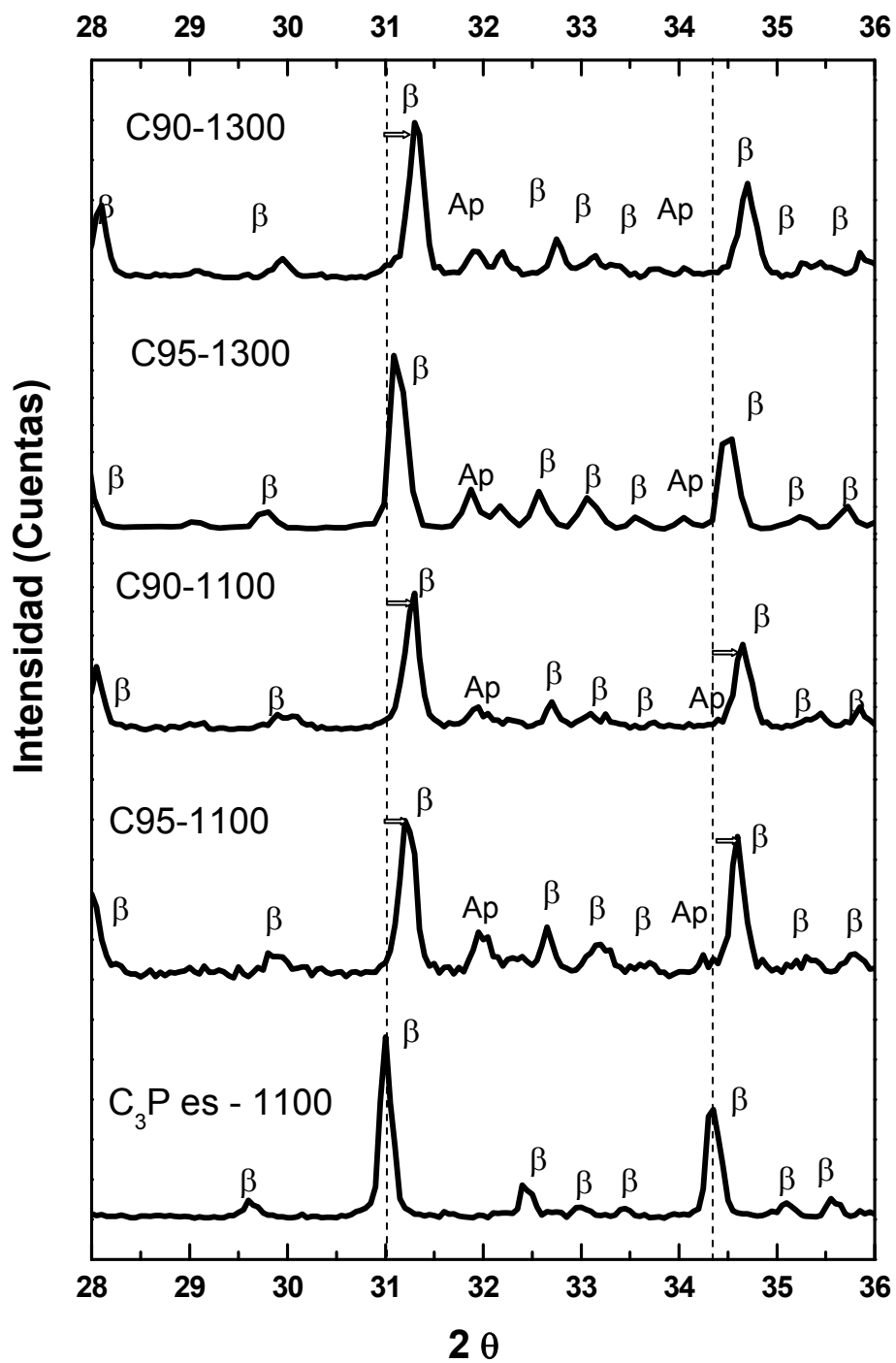
**Figura 5.17** ATD-TG de las tres composiciones precalcinadas a 1100°C/10h (a)  $C_3P$  sintético obtenido por reacción en estado sólido, y (b) C95 y (c) C90 con adiciones de magnesio y silicio. Liq T: líquido transitorio, Liq E: líquido estable, Liq P: líquido peritético.

En la Figura 5.18 se presentan los difractogramas de los productos obtenidos en los polvos calcinados a 1100°C/1300°C. En el difractograma de la composición sin adición de Ca y Mg se puede observar que la única fase estable es  $\beta$ -C<sub>3</sub>P. La ausencia de fases minoritarias permite considerar que las impurezas se encuentran en solución sólida en el compuesto.

Las composiciones C90 y C95 a ambas temperaturas presentan  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, e HAp como fase minoritaria. Como se esperaba de los resultados de ATD, la transformación  $\beta \rightarrow \alpha$  no ha ocurrido a 1300°C en ninguna de las dos composiciones. Hay que señalar el significativo desplazamiento de todos los picos correspondientes al  $\beta$ -C<sub>3</sub>P y que no se detecta la presencia de ninguna segunda fase con MgO y/o SiO<sub>2</sub> lo que sugiere la presencia de Mg y Si en solución sólida en la red cristalina del fosfato tricálcico (posteriormente se ha confirmado mediante MEB-EDE y RMN <sup>29</sup>Si y <sup>31</sup>P).

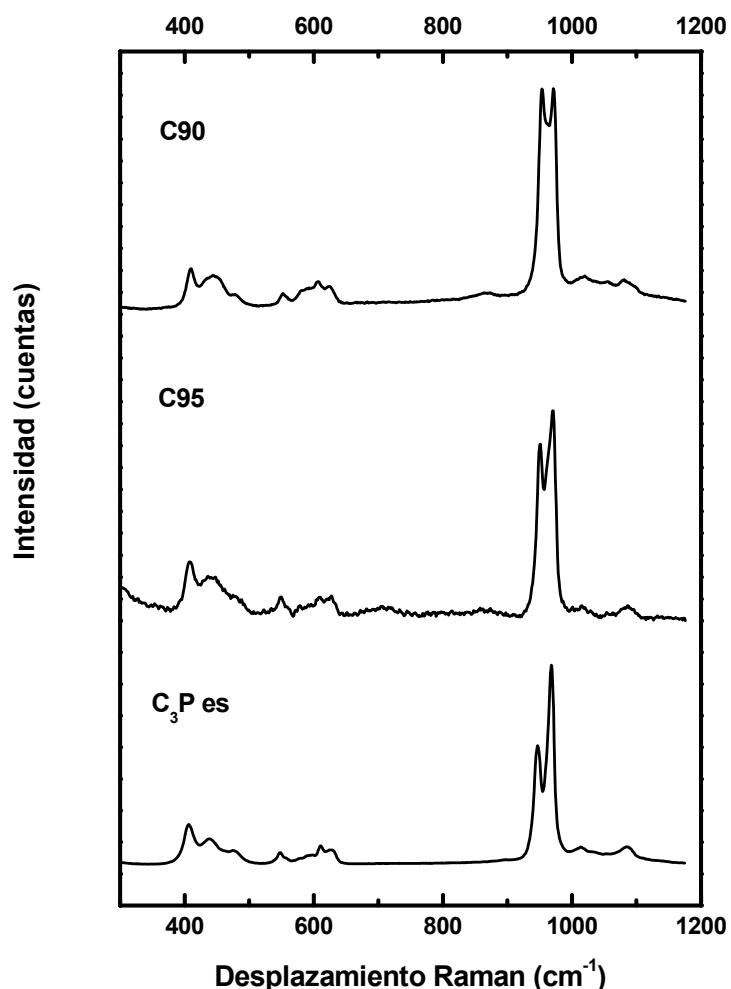
La presencia de pequeñas cantidades de apatita observadas en los difractogramas de los polvos con adiciones de Si y Mg, puede deberse a la formación de pequeñas inhomogeneidades de composición, de pocas micras, en las cuales la relación Ca/P  $\approx$  1,66. Estas inhomogeneidades pueden explicarse por un proceso de molienda-homogeneización insuficiente aunque el material en conjunto sea homogéneo. Por otro lado la molienda se ha realizado en alcohol isopropílico y en atmósfera de aire. La presión parcial de agua en el laboratorio es baja pero es suficiente para que se forme hidroxiapatita como compuesto estable con una composición de 55 % en peso de CaO.

Una vez formada la fase apatita esta se mantiene estable, a la presión parcial de vapor de agua experimental (laboratorio) hasta  $\approx$ 1300°C como se observó en los resultados de DRX de síntesis por precipitación química y puede explicarse con referencia al diagrama de equilibrio de fases CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-H<sub>2</sub>O, Figura 5.15b.



**Figura 5.18** Difractogramas de rayos X de los fosfatos obtenidos por síntesis en estado sólido a 1100°C/ 4horas y 1300°C/4horas.  $C_3P$  puro, C90 y C95.  $\beta$ - $C_3P$  (PDF. 09-0169); HAp :  $Ca_{10}(PO_4)_6OH$  (PDF 09-0432).

En la Figura 5.19 se presentan los espectros Raman de las muestras C90 y C95 tratadas a 1300°C, en ellas se observa que el espectro en los dos casos es típico de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P. La principal diferencia en los espectros Raman con la adición de Mg y Si se aprecia en los picos correspondientes a la frecuencia  $\nu_1$ , en especial en las intensidades relativas, el pico a más bajo desplazamiento, 947 cm<sup>-1</sup>, se hace más intenso al aumentar el contenido en Mg y Si. Además, los dos picos presentan un ligero desplazamiento con el aumento de las adiciones de Mg y Si, el máximo del primer pico pasa de 947 cm<sup>-1</sup> en el puro, a 951 cm<sup>-1</sup> en C95 y 953 cm<sup>-1</sup> en C90, el máximo del segundo pico pasa de 968 cm<sup>-1</sup> en el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P puro, a 970 cm<sup>-1</sup> en C95 y 971 cm<sup>-1</sup> en C90. No se observan nuevos picos que puedan asociarse a la adición de Si y Mg.

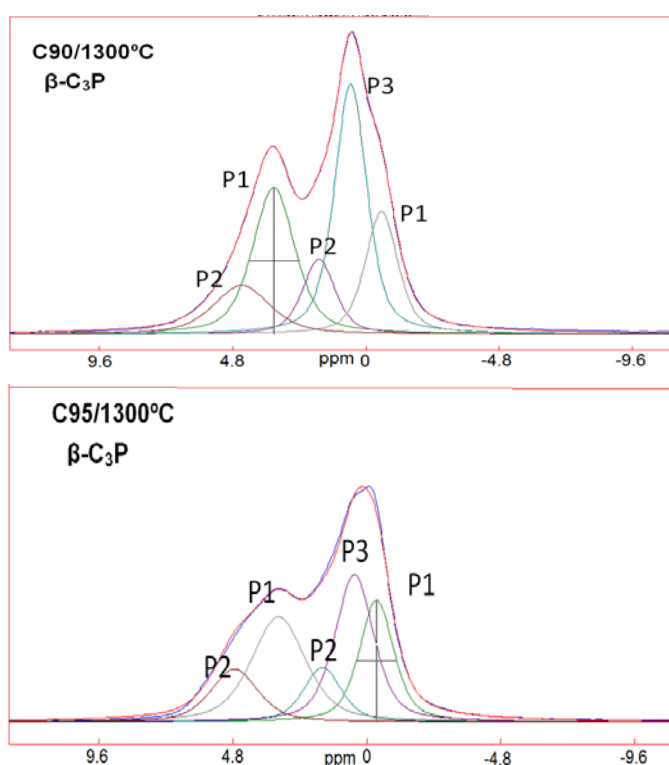


**Figura 5.19:** Espectro de RMN <sup>31</sup>P de los polvos de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P tratado a 1100°C/4h y de C90 y C95 tratados a 1300°C/4horas.



En el capítulo 4, apartado 4.3.4, se ha comprobado mediante microanálisis y DRX que el Si y el Mg entran en solución sólida en el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P demostrando que es posible la sustitución de P por Si en las composiciones C90 y C95.

Teniendo en cuenta que la técnica de RMN es muy sensible al entorno de los átomos de P, se han registrado los espectros de RMN-RAM de <sup>31</sup>P, Figura 5.20, de las muestras sintetizadas por reacción en estado sólido. Es evidente que la sustitución de Si y Mg crea una gran cantidad de entornos diferentes para los átomos de P lo que puede explicar la anchura de los espectros obtenidos respecto a los que no presentan sustitución catiónica.



**Figura 5.20.** Espectros de RMN de <sup>31</sup>P de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P con Si y Mg en solución sólida. C90 y C95 tratados a 1300°C.

La sustitución de Mg por Ca en  $\beta$ -C<sub>3</sub>P ha sido estudiada en trabajos anteriores<sup>(8)</sup>; mostrando que el catión Mg<sup>2+</sup> puede sustituir al Ca<sup>2+</sup> en dos sitios diferentes, Ca(4) en coordinación trigonal planar y Ca(5) en coordinación octaédrica (ver Figura 1.3 y Apéndice 1). Los sitios Ca(5), que representan el 9,09% de los Ca, son substituidos en primer lugar; siendo posteriormente substituidos los sitios Ca(4) que representan el 4,55%. En estos trabajos se mostró un máximo de sustitución de Ca por Mg del 13,6% molar<sup>(5)</sup>.

Puesto que la cantidad de Mg adicionada es de 2,3% molar para C95 y de 4,8% molar para C90, en ninguno de los casos la sustitución alcanza a completar el total de los sitios Ca(5), y por tanto no habrá sustitución de átomos Ca(4). Así, la adición de Mg en estos materiales sólo afectará el entorno de los átomos de P que tienen cerca átomos Ca(5), que según la Figura 5.13a son los P(2) y P(3).

La sustitución de fósforo por silicio (con cargas +5 y +4 respectivamente) cambia el balance de cargas en la estructura del  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, haciendo posible una disminución de la cantidad de vacantes en los sitios Ca(4). La eliminación de vacantes en estos sitios modifica considerablemente la forma y resolución de los componentes en los espectros RMN de fósforo. En los espectros experimentales la resolución de picos es muy pobre, sin embargo, se han desconvolucionado en cinco picos, suponiendo que se conserva la estructura del componente puro. Como se observa en la Figura 5.20 y Tabla 5.16, tanto las posiciones de los componentes como sus intensidades han cambiado significativamente.

Al comparar los espectros de C90 y C95, Figura 5.20 y Tabla 5.16, respecto al del  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, Figura 5.13b, se observa que disminuyen las intensidades de los picos correspondientes a P(2) y P(3) y aumentan los de los P(1), lo que es un indicio de que la sustitución de Si por P, se presenta en las posiciones P(2) y P(3).

**Tabla 5.16.** Espectros de RMN de <sup>31</sup>P de los distintos  $\beta$ -C<sub>3</sub>Pss obtenidos en este trabajo. Se añaden los distintos componentes desconvolucionados

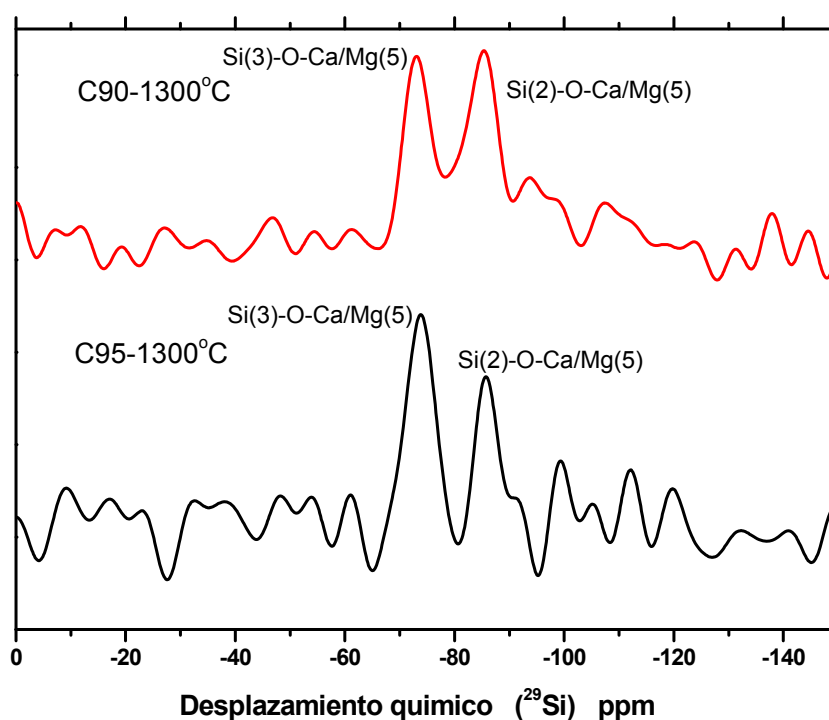
RMN <sup>31</sup> P	$\beta$ -C <sub>3</sub> P /800		C95/1300°C		C90/1300°C	
	$\delta$ iso ppm	(%)	$\delta$ iso ppm	(%)	$\delta$ iso Ppm	(%)
P(2)	4,72	18	4,77	12	4,49	11
P(1)	1,95	11	3,18	28	3,33	26
P(2)'	1,15	18	1,60	10	1,70	10
P(3)	-0,03	46	0,45	28	0.55	35
P(1)'	-1,04	8	-0,35	21	-0,57	17

El cambio en la posición de las componentes se debería a la entrada de Mg en solución sólida en los sitios Ca(5), como se ha expuesto anteriormente; el menor tamaño del Mg debe influir en la posición del máximo de los componentes. Mientras,

que el cambio en las intensidades de los distintos componentes puede atribuirse a la entrada de Si en lugar de P en la estructura del  $\beta$ -C<sub>3</sub>P.

El aumento en la intensidad del pico de P(3) en la muestra C90 respecto a C95, se puede explicar suponiendo que a bajas adiciones, como las usadas en C95, hay una sustitución mayoritaria de Si en posiciones P(3), pero una vez superado cierto valor, la sustitución, se hace más importante en posiciones P(2).

Con objeto de evaluar la forma en que el silicio entra en el fosfato tricálcico se han registrado los espectros RMN de <sup>29</sup>Si, Figura 5.21, de las muestras C95 y C90. Los espectros presentan dos picos, uno con un desplazamiento químico de  $\approx -73$  ppm y otro con un desplazamiento de  $\approx -85$  ppm respecto al compuesto **TMS**. En ambos casos el Si ocupa entornos de tipo Q<sup>o</sup>.



**Figura 5.21.** Espectros <sup>29</sup>Si MAS-RMN de los compuestos dopados con Si obtenidos por reacción en estado sólido. Los desplazamientos químicos están dados respecto a la referencia TMS.

Los espectros de <sup>29</sup>Si RMN de las dos muestras con adiciones de Si y Mg se pueden explicar suponiendo que el Si entra en la red sustituyendo a átomos en posiciones P(2)

y P(3), como se dijo anteriormente. Esta suposición se basa en el hecho que estas posiciones están en el entorno de los Ca(5), que son los únicos  $\text{Ca}^{2+}$  reemplazados por  $\text{Mg}^{2+}$ , más pequeños, y por tanto dejan un espacio mayor para que el  $\text{SiO}_4^{4-}$  más grande sustituya al  $\text{PO}_4^{-3}$ .

El cambio en la relación de intensidades de los picos de  $^{29}\text{Si}$  entre C95 y C90 estaría de acuerdo con la suposición anteriormente expuesta, de que la sustitución de Si es inicialmente más importante en posiciones P(3) y luego en posiciones P(2).

El estudio RMN de  $^{29}\text{Si}$  de los compuestos preparados confirmó la entrada de Si en los sitios P(2) y P(3) de acuerdo con el esquema mencionado. La composición de las soluciones sólidas es del tipo  $\text{Ca}_{3-x+y/2} \text{Mg}_x (\text{P}_{1-y} \text{Si}_y)_2 \text{O}_{8+y/2}$

#### 5.4 Conclusiones

Se han preparado  $\alpha$  y  $\beta$  fosfato tricálcico puros e Hidroxiapatita por la técnica de solución-precipitación. Así mismo, se ha preparado fosfato tricálcico puro y dopado con Si y Mg por reacción en estado sólido.

- Mediante la **técnica de solución-precipitación** se han obtenido polvos monofásicos de fosfato de calcio apatítico  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{OH})_{2-x}$ , con relación molar Ca/P de 1,07; 1,50 y 1,67. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos los parámetros más importantes para el control de la composición del precipitado y las características de los productos obtenidos son: el tiempo de mezclado y de envejecimiento.

Se ha comprobado que muy pequeñas variaciones en la relación molar Ca/P del precipitado dan lugar a grandes cambios en la composición mineralógica y en las características físicas de los polvos obtenidos después del tratamiento térmico.

Así mismo, mediante un control de la temperatura y el tiempo de calcinación se pueden obtener polvos monofásicos de HAp,  $\beta$  o  $\alpha$ - $\text{C}_3\text{P}$  y bifásicos de  $\beta$  y HAp o de  $\alpha$  +  $\beta$ - $\text{C}_3\text{P}$ .

Respecto a la estabilidad térmica de las diferentes fases obtenidas se ha comprobado que para los fosfatos de elevada pureza obtenidos por solución – precipitación se

obtienen polvos monofásicos de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P después de una calcinación a 800°C/4h esta fase se mantiene estable hasta 1100°C, mientras que la HAp es estable en el rango de temperatura entre 800 y 1300°C/4h.

Utilizando polvos activados mecánicamente mediante molienda de atrición se han sintetizado mediante reacción **en estado sólido** polvos altamente reactivos precursores de fosfato tricálcico con composiciones dentro del sistema Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-CaMg(SiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

El análisis estructural de los materiales con adiciones de Si y Mg ha confirmado que el Mg y el Si entran en solución sólida en la estructura del fosfato tricálcico, el Mg ocupa posiciones Ca(4) y el silicio posiciones P(2) y P(3) (cantidades de hasta el 10% en peso de CaMg(SiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>).

Así mismo, mediante un control de la composición, temperatura y el tiempo de calcinación se pueden obtener polvos monofásicos de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P y bifásicos de  $\beta$ + $\alpha$ -C<sub>3</sub>P.

## Referencias:

- 
- <sup>1</sup> J. C. Elliott, Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates, Studies in Inorganic Chemistry, vol. 18, Elsevier, Amsterdam, (1994).
  - <sup>2</sup> N.S. Mandel, "The structural basis of cristal induced membranolysis", *Arthritis Reum.* 19, 439-447, (1976).
  - <sup>3</sup> F.C.M. Driessens, R.M.H. Verbeeck, "Biomaterials", CRC Press, Boca Ratón, Florida, (1990).
  - <sup>4</sup> I.N. Levine, "Fisicoquímica", 3a. Edición, McGraw-Hill, Madrid, (1981).
  - <sup>5</sup> L.C. Chow, S. Takagi, P.D., Costantino, C.D. Friedman, "Self setting calcium phosphate cements", *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* 179, 3-24, (1991).
  - <sup>6</sup> G Vereecke and J Lemaitre. "Calculation of the solubility diagrams in the system  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ ". *J. Cryst. Growth* 104, 820-832, (1990).
  - <sup>7</sup> L. C. Chow, "Development of self-setting calcium phosphate cements", *J. Ceram. Soc. Japan, Int. Ed.*, 99 (1992) 927-936.
  - <sup>8</sup> J. C. Heughebaert, 'Contribution à l'étude de l'évolution des orthophosphates de calcium précipités amorphes en orthophosphates apatitiques', *Thesis*, Institut National Polytechnique, Toulouse, France (1977).
  - <sup>9</sup> S. Somrani, M. Banu, C. Rey, M. Jemal, "Physico-chemical and thermochemical studies of the hydrolytic conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatite". *J Solid State Chem*, 178 [5], 1337–1348, (2005).
  - <sup>10</sup> A. Lebugle, E. Zahidi, G. Bonel, "Effect of structure and composition on the thermal decomposition of calcium phosphates ( $\text{Ca/P} = 1.33$ )", *Reactivity of Solids* 2, 151–161, (1986).
  - <sup>11</sup> A. Rodrigues, A. Lebugle, "Influence of ethanol in the precipitation medium on the composition, structure and reactivity of tricalcium phosphate", *Colloid Surf A*, 145, 191–204 (1998).
  - <sup>12</sup> C. Holt, M. J. J. M. Van Kemenade, L. S. Nelson, D. W. L. Hukins, R. T. Bailey, J. E. Harries, S. S. Hasnain, P. L. De Bruyn, "Amorphous calcium phosphates prepared at pH 6.5 and 6.0", *Mater Res Bull*, 24[1], 55–62(1989),.
  - <sup>13</sup> A. Destainville, E. Champion, D. Bernache-Assollant, Laborde E, "Synthesis, characterization and thermal behavior of apatitic tricalcium phosphate", *Mater Chem Phys*, 80, 269–277(2003).

- 
- <sup>14</sup> E. D. Eanes, "Thermochemical studies on amorphous calcium phosphate", *Calcif Tissue Res*, 5 [2], 133–145, (1970).
- <sup>15</sup> C. Rey, C. Combes, C. Drouet, C. Somrani, "Tricalcium phosphate-based ceramics. Chapter 15 in: Bioceramics and their clinical applications", Edited by Tadashi Kokubo. Chubu University Japan (2008).
- <sup>16</sup> J. H. Welch, W. Gutt, "High-temperature studies of the system calcium oxidephosphorus pentoxide", *J Chem Soc*, 4442–4444, (1961).
- <sup>17</sup> P. Belgrand, 'Apport de la RMN; de l'état solide à l'étude de biocéramiques de phosphate tricalcique et de pathologies osseuses', *Thesis*, Université Paris VI, France, (1993).
- <sup>18</sup> S. Somrani, C. Rey, M. Jemal, "Thermal evolution of amorphous tricalcium phosphate", *J Mater Chem*, 13, 888–892, (2003).
- <sup>19</sup> X. Ranz, "Développement et caractérisation de dépôts d'apatite obtenus par projection plasma sur prothèses orthopédiques", PhD Thesis no. 1162, INPT, Toulouse, France, (1996).
- <sup>20</sup> X. Yang, Z. Wang, "Synthesis of biphasic ceramics of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate with controlled phase content and porosity", *J Mater Chem*, 8, 2233–2237 (1998).
- <sup>21</sup> M. Vallet-Regi, M. Gordo, C. V. Ragel, M. V. Cabanas, J. San Roman, "Synthesis of ceramic-polymer-drug biocomposites at room temperature", *Solid State Ionics*, 101–103, 887–892, (1997).
- <sup>22</sup> R. Enderle, F. Göz-Neunhoeffler, M. Göbbels, F.A. Müller, P. Greil "Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of  $\beta$ -TCP ceramics examined by Rietveld refinement" *Biomaterials* 26, 3379–3384, (2005).
- <sup>23</sup> Katsumi Yoshida, W. Hideki Hyuga, Naoki Kondo, Hideki Kita, Miho Sasaki, Masanori Mitamura, Kazuaki Hashimoto, and Yoshitomo Toda. "Substitution Model of Monovalent (Li, Na, and K), Divalent (Mg), and Trivalent (Al) Metal Ions for  $\beta$ -Tricalcium Phosphate" *J. Am. Ceram. Soc.*, 89 [2] 688–690 (2006)
- <sup>24</sup> Miquel JL, Facchini L, Legrand AP, Rey C, Lemaître J. Solid-state NMR to study calcium-phosphate ceramics. *Colloids Surf* 1990;45:427
- <sup>25</sup> P. S. Belton, R. K. Harris, P. J. Wilkes. "Solid-state phosphorus-31 NMR studies of synthetic inorganic calcium phosphates". *J. Phys. Chem. Solids*, 49 21–27, (1988).
- <sup>26</sup> A. Mortier, J. Lemaître, P.G. Rouxhet, "Temperature-programmed characterization of synthetic calcium-deficient phosphate apatites". *Thermochim. Acta* 143, 265, (1989).

- 
- <sup>27</sup> P. N. de Aza, C. Santos, A. Pazo, S. de Aza, R. Cusco and L. Artu's. "Vibrational Properties of Calcium Phosphate Compounds. 2. Comparison between Hydroxyapatite and  $\beta$ -Tricalcium Phosphate". *Chem. Mater.*, 9, 916-922, (1997).
- <sup>28</sup> Sanjeevi Kannan et al. *J. Am. Ceram. Soc.*, 89 [9] 2757–2761 (2006)
- <sup>29</sup> A. Jillavenkatesa, R. A. Condrate Sr. "The infrared and Raman spectra of  $\beta$ - and  $\alpha$ -tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ )". *Spectrosc Lett*, 31[8]:1619–1634, (1998).
- <sup>30</sup> M. Yashima, A. Sakai, T. Kamiyama, A. Hoshikawa, "Crystal structure analysis of beta-tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  by neutron powder diffraction". *Journal of Solid State Chemistry* 175, 272-277, (2003).
- <sup>31</sup> Mathew, M.;Schroeder, L.W.;Dickens, B.;Brown, W.E. "The crystal structure of alpha- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Golden Book of Phase Transitions, Wroclaw (2002) 1, 1-123 y *Acta Crystallographica B* 33, 1325-1333 (1977)
- <sup>32</sup> G. Renaudin, P. Laquerrie`reb Y. Filinchuk, E. Jallotd and J. M. Nedelec. "Structural characterization of sol–gel derived Sr-substituted calcium phosphates with anti-osteoporotic and anti-inflammatory properties".*Journal of Materials Chemistry*, 18, 3593-3600, (2008).
- <sup>33</sup> R. J. B. Jakeman, A. K. Cheetham, N. J. Clayden and C. M. Dobson. "A Magic Angle Spinning NMR Study of the Phase Diagram  $\text{Ca}_{3-x}\text{Zn}_x(\text{PO}_4)_2$ . *Journal of Solid State Chemistry* 78, 23-34, (1989).
- <sup>34</sup> L. Obadia, P. Deniard, B. Alonso, T. Rouillon, S. Jobic, J. Guicheux, M. Julien, D. Massiot, B. Bujoli, J. M. Boulter, "Effect of Sodium Doping in  $\beta$ -Tricalcium Phosphate on Its Structure and Properties" *Chem. Mater.*, 18, 1425-1433, (2006).
- <sup>35</sup> B. Dickens, I. W. Schroeder, and W. E. Brown, Solid-state phosphorus-31 NMR studies of synthetic inorganic calcium phosphates. *J. Solid State Chem.* 10, 232 (1974).
- <sup>36</sup> M. Bohner, J. Lemaitre, *Journal Materials Science. Materials in Medicine* 7, 457-463 (1996).
- <sup>37</sup> P. V. Riboud, "Composition and stability of apatites in the system  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ –iron oxide– $\text{H}_2\text{O}$  at high temperature," *Ann. Chim.*, 8, 381–390 (1973).
- <sup>38</sup> R. García Carrodegua, A. H. De Aza, X. Turrillas, P. Pena, and S. De Aza, "New Approach to the  $\alpha$ - $\beta$  Polymorphic Transformation in Magnesium-Substituted Tricalcium Phosphate and its Practical Implications", *J. Am. Ceram. Soc.*, 91 [4] 1281-1286 (2008).



**Capítulo 6.**

**OBTENCION DE COMPACTOS EN EL SISTEMA  
FOSFATO TRICALCICO-DIOPSIDO.  
CARACTERIZACION MICROESTRUCTURAL,  
MINERALOGICA Y MECANICA.**



En este capítulo se estudiarán los parámetros de procesamiento más significativos en la obtención de materiales de  $C_3P-CMS_2$  por sinterización reactiva de mezclas de fosfato tricálcico- $CaO-MgO-SiO_2$ . Es bien conocido que la temperatura y el tiempo óptimos de un proceso de sinterización reactiva dependen de la composición y de las características de las materias primas, particularmente de su pureza, homogeneidad y distribución del tamaño de partícula. En este apartado se estudiará el efecto de tales variables en la síntesis de materiales de fosfato tricálcico con Si y Mg en solución sólida y de materiales de fosfato tricálcico– dióxido.

## **6.1 Revisión Bibliográfica.**

### **6.1.1 El procesamiento cerámico**

El procesamiento cerámico se define como el conjunto de operaciones de: mezclado, homogeneizado, compactación, sinterización, mecanizado, etc. necesarios para la obtención de un material cerámico susceptible de ser utilizado en una aplicación específica.

Durante el procesamiento cerámico, las características estructurales y constitucionales de los polvos de partida se van desarrollando y modificando en cada etapa de forma que las propiedades finales del material dependen de todos y cada uno de los pasos previos. Si se representa el procesamiento como una cadena, el producto final contendrá términos que representan todos los eslabones del proceso, así como las particularidades de los materiales de partida o en cualquier etapa del procesamiento producirá un cambio en las propiedades del producto final.

La falta de fiabilidad y reproducibilidad del proceso de obtención de los materiales cerámicos, se atribuye a la presencia de irregularidades, defectos, en la microestructura del material cerámico.<sup>(1)</sup>

Las propiedades tanto de los productos finales como de los intermedios e iniciales se clasifican en dos grupos: 1) propiedades de comportamiento (expansión térmica, tenacidad, módulo elástico, conductividad térmica, resistencia a la corrosión, permeabilidad magnética, etc); 2) propiedades características, éstas son de dos tipos: a) las constitucionales y b) las estructurales. Las primeras se refieren al tipo y cantidad de las fases sólidas y pueden predecirse a partir de los datos del diagrama de equilibrio adecuado. Las estructurales consideran el tamaño y la distribución de

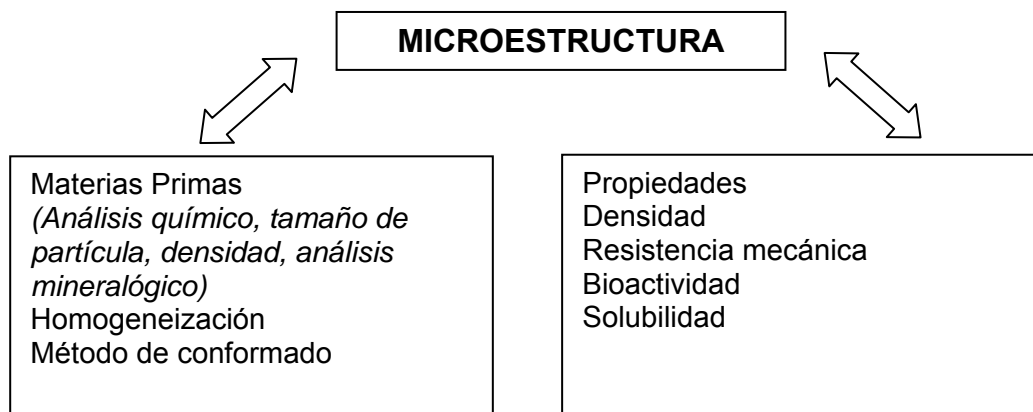
dichas fases, así como su posible orientación, estructura cristalina y orden estructural. Resulta conveniente considerar igualmente las dimensiones del material cocido e intermedio como características estructurales (por ejemplo: la contracción y defectos superficiales).

Un proceso cerámico puede ser considerado como una secuencia de operaciones que transforman el material de partida, a través de pasos o productos intermedios en el producto final. Se puede representar simbólicamente cada operación de procesamiento por un operador  $P_i$  y las características de los materiales de partida por  $S$ . En el primer estado del procesamiento los materiales de partida son transformados en el primer producto intermedio  $P_1(S)$ , que continuará su procesamiento mediante la aplicación de  $P_2, P_3$ , etc, hasta que el producto final sea el resultado de  $n$  operaciones, esto es:

$$P_n[P_{n-1}(\dots P_2[P_1(S)])] \quad \{6.1\}$$

El procesamiento cerámico difiere de otros procesamientos en que las características, tanto estructurales como constitucionales, de los materiales de partida son modificadas y desarrolladas en cada etapa sucesiva, y no pueden ser canceladas por ninguna operación. Por tanto, cualquier cambio en  $S$  o  $P_i$  redundará en un cambio en el producto final.

Para el completo entendimiento de un procesamiento, es necesario establecer las posibles correlaciones entre las variables de procesamiento y las propiedades del producto final, tal como muestra la Figura 6.1.



**Figura 6.1** Relación de los parámetros de procesamiento con las propiedades de los materiales cerámicos.

La relación entre las variables de procesamiento y las propiedades de comportamiento, puede establecerse de forma directa, o bien a través de las propiedades características. En cualquier caso, para entender la relación entre el procesamiento y el comportamiento, es necesario conocer la relación entre las propiedades características y las propiedades de comportamiento. Por tanto, la conexión directa es por sí misma inadecuada. Como ejemplo de esto último, es bien conocido que un polvo con unas características definidas ( $d$ ,  $Se$ ) durante la molienda sufre una reducción en el tamaño de las partículas, deterioro en su estructura cristalográfica, etc, que lo puede apartar notablemente de las características de partida ( $d$ ,  $Se$ ).

La correlación entre una variable de procesamiento y una propiedad característica, que puede ser mostrada gráficamente, requerirá que sean considerados como parámetros, tanto las demás variables de procesamiento como las propiedades características de los materiales de partida.

Debido a la gran cantidad de datos, que pueden ser necesarios para buscar las relaciones entre las variables de procesamiento y las propiedades características, el entendimiento de las mismas se efectuará generalmente de una manera cualitativa.

Las correlaciones entre las propiedades características y las propiedades de comportamiento, no son habitualmente simples. La relación entre una variable de comportamiento y una característica, será válida únicamente cuando se cumpla una de las siguientes condiciones: a) la propiedad característica es la única que varía; b) el efecto en el comportamiento de la propiedad característica variable es predominante, siendo despreciables los posibles cambios en las demás características.

Para un buen entendimiento del proceso cerámico, deben ser encontradas las dependencias existentes entre las variables de procesamiento y las propiedades características, así como las existentes entre las propiedades características y las de comportamiento. En el primer caso es necesario que las características de los materiales de partida y las variables de procesamiento, a excepción de una que es la alterada, sean consideradas como parámetros. En el segundo, es posible encontrar una expresión analítica, que relacione la propiedad de comportamiento con la característica que lo condiciona<sup>(2)</sup>.

Variables de procesamiento:

- a) Composición.
- b) Materias primas: Composición, forma y tamaño de partícula, grado de aglomeración, superficie específica, cristalinidad.
- c) Método de conformado: 1) en seco: Prensado axial, isostático, en caliente. 2) En húmedo: colaje convencional, colaje bajo presión, etc.
- d) Método de sinterización: Ciclo térmico, atmósfera, etc.
- e) Acabado final.

En la Tabla 6.1. se relacionan los factores de procesamiento que influyen sobre la microestructura y los parámetros microestructurales sobre los que incide cada uno de ellos.

**Tabla 6.1.** Factores que influyen en el procesamiento

<b><i>Procesamiento</i></b>	<b><i>Factores que influyen en el procesamiento</i></b>	<b><i>Microestructura</i></b>
<b>Materias primas:</b> Polvo	Pureza	Tamaño, forma, composición.
<b>Proceso:</b> Molienda  Ligantes y Aditivos Mezclado Secado	Tamaño y distribución de partícula  Tipo y cantidad de aditivos	Homogeneidad Tamaño de grano  Bordes de fase Fases secundarias
<b>Conformado:</b> Prensado Uniaxial Prensado isostático Extrusión Moldeo por inyección Colaje, colaje en cinta	Dirección de prensado	Textura Porosidad
<b>Sinterización:</b> Convencional Prensado en caliente En fase líquida	Velocidad de calentamiento Temperatura de sinterización Atmósfera	Densidad Tamaño de grano Vidrios o fases cristalinas

### 6.1.2 Sinterización, procesamiento y propiedades mecánicas de cerámicos de $C_3P$

La principal dificultad en la sinterización de las cerámicas de  $\beta$ - $C_3P$  es la temperatura de transición polimórfica  $\beta \rightarrow \alpha$ - $C_3P$ . Para el  $C_3P$  puro, esta transición ocurre a  $1125^\circ\text{C}$ ; sin embargo, puede ocurrir a temperaturas más altas si contiene impurezas al nivel de trazas, de Mg, Fe, Mn y Zn, lo que permite realizar el proceso de sinterización a temperaturas más elevadas<sup>(3)</sup>.

A pesar del efecto de estos elementos traza, especialmente del Mg y Fe, los contaminantes más comunes de las sales de calcio, son muy pocas veces analizados en el  $C_3P$ . Prácticamente todos los polvos de  $\beta$ - $C_3P$  se sinterizan entre  $1100$  y  $1250^\circ\text{C}$ , dependiendo de las características del polvo inicial y la densidad final esperada. El crecimiento de grano y el porcentaje de la conversión en  $\alpha$ - $C_3P$  aumentan a temperaturas superiores a  $1250^\circ\text{C}$ , lo que compromete la densificación y las propiedades mecánicas de la cerámica. La composición del polvo inicial también es un parámetro determinante, un exceso de calcio ( $\text{Ca/P} > 1.52$ ) facilita la transformación en  $\alpha$ - $C_3P$  y una baja relación Ca/P ( $\text{Ca/P} < 1.42$ ) conduce a la formación de inclusiones de pirofosfato cálcico ( $\beta$ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) lo cual hace más lento el proceso de sinterización.

En un trabajo publicado por Wang, y col.<sup>(4)</sup>, se ha demostrado que las condiciones de sinterización tienen un importante impacto sobre el comportamiento mecánico de las cerámicas de  $\beta$ - $C_3P$ . A temperaturas inferiores a  $1300^\circ\text{C}$ , la dureza y el módulo de Young aumentan con la temperatura de sinterización, pero a temperaturas superiores, se observa una caída del módulo de Young. Entre  $1300$  y  $1400^\circ\text{C}$ , parte del  $\beta$ - $C_3P$  se transforma en  $\alpha$ - $C_3P$  lo que contribuye a la disminución del módulo de Young.

Raynaud y col.<sup>(5)</sup> demostraron que es necesario controlar de forma precisa la relación Ca/P de estos materiales para controlar su resistencia a la fractura. Además, Varma y Sureshbabu<sup>(6)</sup> observaron un crecimiento orientado de los cristales de  $\beta$ - $C_3P$  en la superficie del cuerpo sinterizado y diferencias importantes en los tamaños de grano entre la superficie y el interior de la muestra.

Se pueden preparar cerámicas bifásicas de  $\alpha$ - y  $\beta$ - $C_3P$  con una relación  $\alpha / \beta$  controlada mediante sinterización reactiva de mezclas de hidroxiapatita y fosfato dicálcico impregnados con una solución de acetato de Mg o nitrato de Mg que

estabiliza la fase  $\beta$ -C<sub>3</sub>P<sup>(7)</sup>. También se han obtenido cerámicas bifásicas mediante procesamiento a altas temperaturas de una mezcla íntima de CaHPO<sub>4</sub> (DCPA) o CaHPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (DCPD) y CaCO<sub>3</sub>.<sup>(8,9)</sup>

## 6.2. Procedimiento Experimental

Las materias primas utilizadas fueron fosfato tricálcico sintético, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, preparado por sinterización reactiva de mezclas de CaCO<sub>3</sub> y CaHPO<sub>4</sub> (corresponde al C<sub>3</sub>P-es del apartado 5.3), las condiciones de síntesis y su caracterización se describen en el capítulo 5. El dióxido CaMg(SiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> se ha obtenido por sinterización reactiva, CaCO<sub>3</sub> (> 99% en peso, Panreac, Barcelona, España), Sílice amorfa (> 99.8 % en peso, Strem Chemicals Inc., Newburyport, MA), y MgO (> 99.6 % en peso, Fluka, Darmstadt, Germany). El MgO fue previamente calcinado a 950 °C para remover el agua adsorbida y otros volátiles. El análisis químico y las características físicas de las materias primas se presentan en detalle en el capítulo 3.

Se han preparado tres composiciones CX (X=95, 90 y 40) donde X es el porcentaje en peso de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> en una mezcla Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> - CaMgSiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>. La composición C40 se ha preparado mediante sinterización convencional de la mezcla de polvos de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> y CaMg(SiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> sintetizados según se ha descrito en el capítulo 5. Las composiciones C90 y C95 se han preparado por sinterización reactiva de mezclas de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-CaCO<sub>3</sub>-SiO<sub>2</sub>-MgO.

Mezclas de polvos con las relaciones requeridas de los materiales de partida para cada composición se han homogeneizado y molido usando bolas de zirconia parcialmente estabilizada (3 % molar itria, PSZ Tosoh, Japan) a una velocidad de rotación de 1000 rpm durante 1 hora hasta obtener un tamaño de partícula promedio de ~ 2 µm (Tabla 6.2). La relación sólido:líquido (isopropanol) en volumen fue 2:3 y la relación bolas:polvo en peso fue 5:1. Después de la molienda, el polvo obtenido se secó a 60°C durante una noche y el polvo fue tamizado a través de una malla de 100 µm para facilitar el prensado.

Cada una de las mezclas de polvos fue analizada mediante ATD-TG y fue estudiada su sinterización a una velocidad de calentamiento constante de 10°C·min<sup>-1</sup> en aire en un dilatómetro diferencial (Ver condiciones de los ensayos en el Capítulo 3).



Compactos en verde de 10 mm de diámetro y 3 mm de espesor de las tres composiciones se prepararon mediante compresión uniaxial en un molde de acero inoxidable a 125 MPa. Los compactos fueron tratados térmicamente durante 4 horas en un horno eléctrico a distintas temperaturas: C40 a 1225°, 1250° y 1275°C; y C90 y C95 a 1100°, 1200°, 1300°, 1400° y 1450°C. Cuando se consideró necesario se incluyó un palier de 1 hora a 800°C para descomponer el  $\text{CaCO}_3$ , la velocidad de calentamiento fue de 5°C/min y la de enfriamiento 10°C/min. Las muestras fueron colocadas sobre láminas de platino para evitar reacción con el soporte durante el tratamiento térmico. Se obtuvieron materiales sinterizados de  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\alpha+\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ , con microestructuras diferentes. La densidad de los cuerpos sinterizados fue medida mediante el método de Arquímedes.

Las fases cristalinas presentes en los materiales sinterizados se han identificado mediante difracción de rayos X (DRX). Los difractogramas fueron comparados con los estándar de la base de datos de Joint Committee on Powder Diffraction Standards (JCPDS) publicados para  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF #9-348),  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF #9-169/70-2065), HAp (PDF # 9-432) y  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  (PDF #86-0932).

La microestructura de los cuerpos sinterizados se estudió mediante microscopía óptica de luz reflejada (MOLR) y Microscopía Electrónica de Barrido de Emisión de Campo (MEB-EC).

La caracterización mecánica se ha realizado utilizando dos metodologías: a) compresión diametral y b) flexión en tres puntos

El método de compresión diametral se utilizó con el objetivo de determinar el  $\text{C}_3\text{Pss}$  con mejor comportamiento mecánico utilizando pequeñas cantidades de fosfato tricálcico. Se estudiaron dos composiciones de fosfato tricálcico con Si y Mg en solución sólida ( $90\text{C}_3\text{P}-10\text{CMS}_2 = \text{C90}$  y  $95\text{C}_3\text{P}-5\text{CMS}_2 = \text{C95}$ ), sinterizadas a diversas temperaturas, y se estudió también el  $\text{C}_3\text{P}$  que se usó como materia prima sin adiciones de Si y Mg (C99) con fines comparativos. El estudio se realizó sobre probetas en forma de discos circulares (15 por cada composición y temperatura) obtenidos mediante sinterización desde compactos en verde de 10mm de diámetro y 3mm de espesor. Las medidas finales fueron  $8,7\pm 0,3$  mm en diámetro (D) y  $2,6\pm 0,2$  mm de espesor (e), con una relación  $e/D \approx 0,3$ . En el capítulo 3 se detalla la preparación de las muestras y las condiciones experimentales.

La resistencia a la flexión de los dos materiales, seleccionados teniendo en cuenta los estudios de sinterización reactiva y los ensayos de compresión diametral, se determinó utilizando el método de flexión en tres puntos. El estudio se realizó sobre muestras, en forma de barras rectangulares de  $25 \times 2,5 \times 2 \text{ mm}^3$ , de las composiciones C40 y C95 sinterizadas a  $1250^\circ\text{C}/4\text{h}$ . En el capítulo 3 se detalla la preparación de las muestras y las condiciones experimentales.

### 6.3 Resultados

Los materiales estudiados se han formulado teniendo en cuenta las relaciones de equilibrio en el sistema pseudobinario  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  establecido en el capítulo 4, Figura 4.9. Las composiciones están en dos zonas de este diagrama, la composición C40 está cerca del eutéctico (37%  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -63%  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ ) y las otras dos composiciones están en el área rica en  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Se diseñaron materiales con composiciones mineralógicas diferentes en el rango de temperaturas de interés para los biomateriales ( $1100\text{-}1450^\circ\text{C}$ ) (Figura 4.9). Para la composición C40 la temperatura de formación del primer líquido es  $1300 \pm 5^\circ\text{C}$ , punto eutéctico del sistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ . Las composiciones C90 y C95 están localizadas en el área de solución sólida del  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  del sistema. Para la composición C90 la única fase cristalina presente hasta  $T=1440^\circ\text{C}$  es  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss punto invariante peritético. En la composición C95 el  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss es estable hasta  $\approx 1300^\circ\text{C}$  a temperaturas superiores se forma una mezcla de  $\alpha$  y  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

#### 6.3.1 Estudio de la sinterización:

Teniendo en cuenta el sistema binario  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  se calcularon las proporciones de las materias primas necesarias para obtener materiales con las composiciones diseñadas.

La Tabla 6.2 muestra las características físicas de los polvos originales y de las mezclas después de la molienda. En las mezclas de C90 y C95, el compuesto mayoritario inicial,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , tiene un tamaño de partícula relativamente pequeño con una distribución estrecha. Sin embargo, el polvo de calcita original presenta una morfología formada por granos grandes de  $\text{CaCO}_3$  ( $15\text{-}46 \mu\text{m}$ ) y la sílice amorfa presenta una amplia distribución de tamaño de grano ( $49\text{-}228 \mu\text{m}$ ). Por lo tanto, se consideró necesaria la molienda para asegurar que los componentes minoritarios se

distribuyeran homogéneamente a través de las mezclas en forma de pequeñas partículas. Como se muestra en la Tabla 6.2, después de una molienda de una hora se obtuvieron mezclas con parámetros de tamaño similares a las del compuesto de partida mayoritario. A pesar de que C90 presenta unos parámetros de distribución de tamaño un poco más grandes, ambas mezclas presentan superficies específicas similares.

Las porosidades en verde, 62,0; 61,5 y 60,8 % para C95, C90 y C40, respectivamente, se han calculado teniendo en cuenta las densidades aparentes de los cuerpos en verde ( $1,83 \pm 0,02$ ,  $1,79 \pm 0,02$  y  $1,868 \pm 0,005$  g/cm<sup>3</sup> para C95, C90 y C40, respectivamente) y las densidades teóricas de las mezclas de partida (2,95, 2,91 y 3,07 g/cm<sup>3</sup>), para C95 y C90, respectivamente.

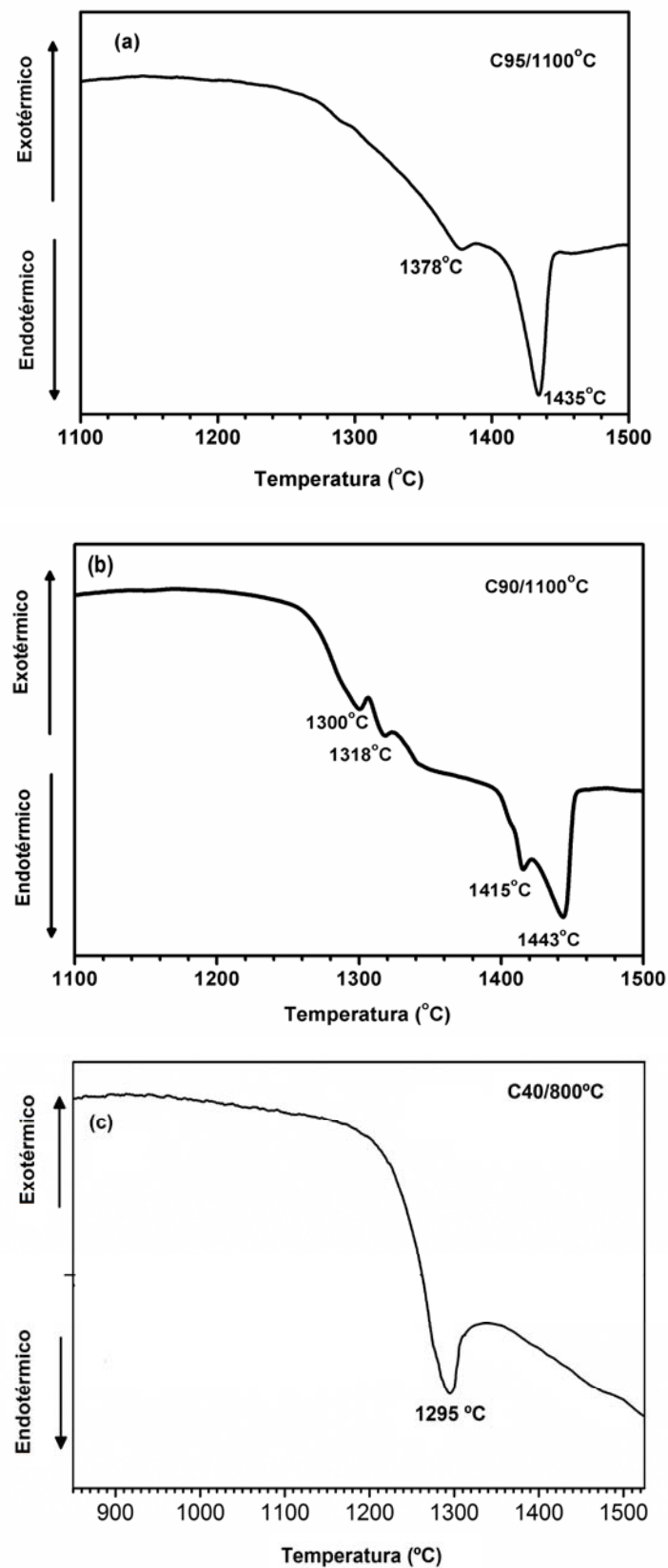
La Figura 6.2 muestra las curvas de ATD y sinterización para las composiciones estudiadas obtenidas durante los experimentos a velocidad de calentamiento constante.

Los picos observados en las curvas de ATD se atribuyen a diferentes reacciones que corresponden con el diagrama de equilibrio CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-MgO-SiO<sub>2</sub>, Figura 4.9.

La muestra C40 muestra un ATD sin picos hasta 1200°C, lo que indica que no hay transformaciones que impliquen intercambios de calor o cambios de volumen; a 1200°C se inicia un pico fuertemente endotérmico característico de la presencia de fases líquidas que se atribuye a una fusión con máximo a 1290°C. El ATD no está afectado por la transformación  $\beta \rightarrow \alpha$  puesto que el Mg estabiliza el polimorfo  $\beta$  hasta la temperatura de fusión.

La curva de sinterización de la muestra C40 se muestra en la Figura 6.3c. El hábito de la curva de sinterización sugiere que esta tiene lugar en presencia de fases líquidas, que se han podido formar por la presencia de pequeñas cantidades de impurezas en la composición (SiO<sub>2</sub>, MgO, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y alcalinos) y/o a la reacción del C<sub>3</sub>P con el CMS<sub>2</sub> para formar las fases en equilibrio a la temperatura de sinterización (C<sub>3</sub>Pss-CMS<sub>2</sub>).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los estudios de ATD y de contracción durante el calentamiento se decidió realizar, para optimizar el ciclo térmico, tratamientos térmicos de cuatro horas cada 25 ° C, en el intervalo de temperaturas 1225 y 1275 ° C.



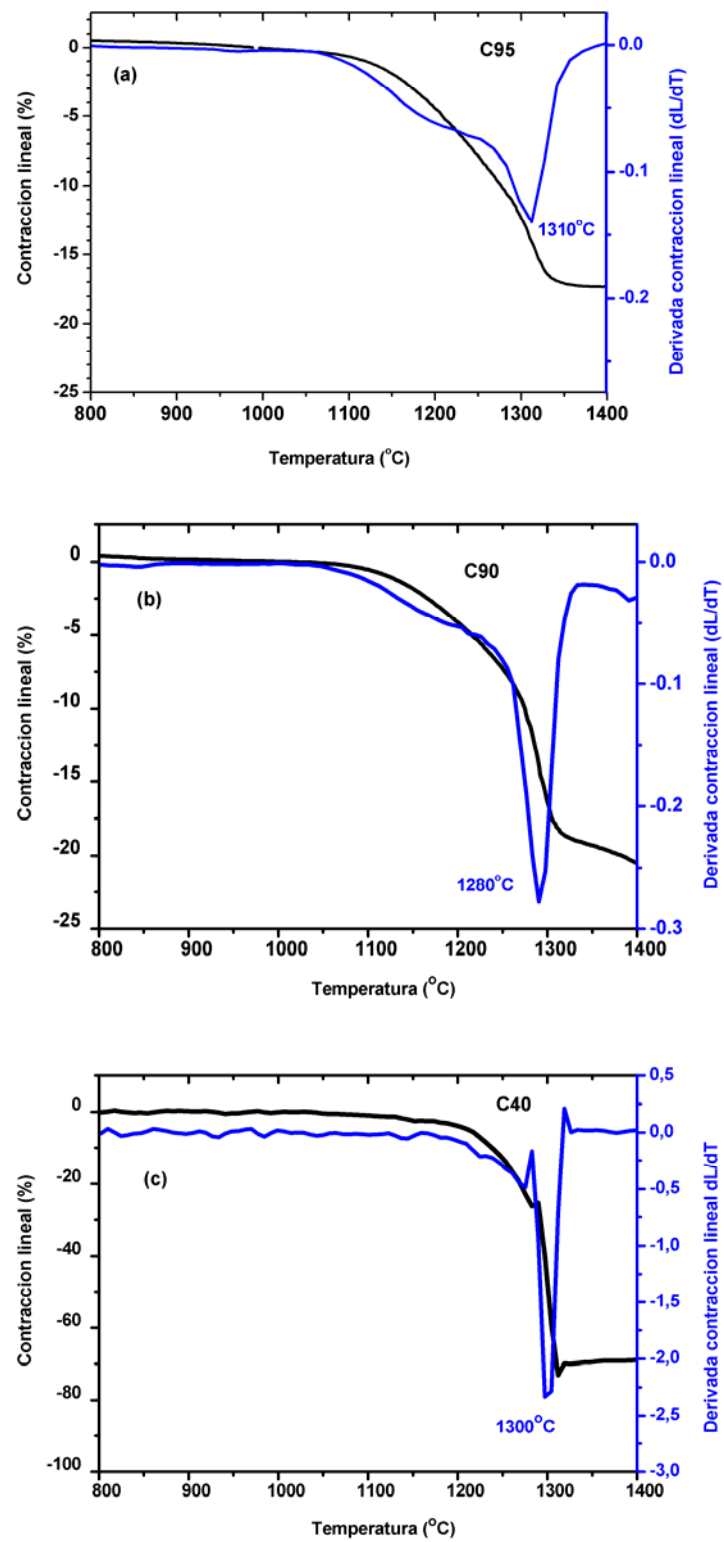
**Figura 6.2.** ATD y TG de la mezcla de las composiciones (a) C95, (b) C90 tratadas a 1100°C y (c) C40 tratada a 800°C

El ATD de la muestra C95 presenta los picos asociados a la transformación del  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  durante el calentamiento fueron observados a 1378°C (Figura 6.2b). El pico con un máximo a  $\approx 1440^\circ\text{C}$  observado en las composiciones C90 y C95 corresponde a la formación de líquido asociado con la reacción peritética  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{ss} \rightarrow \alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{ss} + \text{Liq.}$

Los picos adicionales que aparecen en la composición C90 se pueden atribuir a la formación de fases líquidas transitorias que pueden corresponder al eutéctico del sistema  $\text{C}_3\text{P-CMS}_2\text{-S}$  ( $1277^\circ\text{C}$ )<sup>(10)</sup>, al eutéctico binario  $\text{C}_3\text{P-CMS}_2$  ( $1300^\circ\text{C.}$ ) y/o a fases líquidas estables (máximo a  $\approx 1415^\circ\text{C}$ , línea de subsolidus eutéctico  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{ss} + \text{Liq.}$ ).

Para las composiciones C90 y C95 la sinterización empieza a temperaturas similares ( $\approx 1100^\circ\text{C}$ ) (Figura 6.3). Este hecho indica que el inicio de la sinterización en estado sólido en los dos materiales, los cuales están constituidos en verde por polvos con densidades y áreas superficiales similares está determinada por estos parámetros microestructurales y no está afectada por las ligeras diferencias composicionales. Sin embargo, a temperaturas más altas surgen diferencias significativas, como se describe a continuación, debido a las diferentes rutas de reacción como consecuencia de las diferencias en la composición.

Para C90, la velocidad de contracción aumenta considerablemente a  $1220^\circ\text{C}$ , la muestra experimenta grandes contracciones (desde  $\approx 8\%$  hasta  $\approx 19\%$ ) en un pequeño intervalo de temperatura ( $1220^\circ\text{C} - 1330^\circ\text{C}$ ) tal como las que ocurren durante la sinterización en estado líquido. Antes de este aumento, la contracción se detuvo levemente lo que se puede atribuir a la formación de una fase de baja densidad tal como un líquido (eutéctico del sistema  $\text{C}_3\text{P-CMS}_2\text{-S}$ ). En la muestra C95, estas características se observaron a una temperatura más alta ( $1260^\circ\text{C}$ ), la contracción repentina es del mismo orden (de  $\approx 7\%$  a  $\approx 17\%$ , hasta  $T \approx 1360^\circ\text{C}$ ). Estas características se pueden explicar mediante la formación de líquido en las dos series de compactos, tal como se describe para C90. La formación de líquido se puede producir a temperaturas inferiores a la del eutéctico del sistema pseudobinario debido a pequeñas cantidades de impurezas propias de los sistemas reales. En C95 la contracción se detuvo por completo a  $1360^\circ\text{C}$ , mientras que en C90 continuó hasta temperaturas superiores a  $1330^\circ\text{C}$ . Esta diferencia se debe al carácter transitorio de los líquidos formados en C95 y el carácter permanente de los formados en el C90.



**Figura 6.3.** Contracción lineal y su derivada versus la temperatura de compactos en verde de las composiciones a) C95, y b) C90; c) contracción lineal para el compacto C40. Velocidad de sinterización  $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ .

**Tabla 6.2.** Características físicas de las materias primas. n.d.= sin determinar.

	Características de los polvos					
	Distribución del tamaño de partícula				Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Se (m <sup>2</sup> ·g)
	d <sub>10</sub> (μm)	d <sub>50</sub> (μm)	d <sub>90</sub> (μm)	Aspecto de la curva granulométrica		
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,4	2,3	4,6	Bimodal	2,98	1,1
CaMg(SiO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,6	1,9	4,6	Unimodal	3,23	n.d.
CaCO <sub>3</sub>	16	31	47	Unimodal	2,67	0,03
MgO	3,3	7,3	15	Unimodal	3,20	29,5
SiO <sub>2</sub>	49	120	228	Unimodal	2,22	0,04
C95 (1h)	0,7	1,6	3,6	Unimodal	3,01	2,4
C90 (1h)	1,5	3,3	7,0	Bimodal	2,99	2,3
C40 (1h)	0,5	2,1	4,6	Unimodal	3,08	n.d.

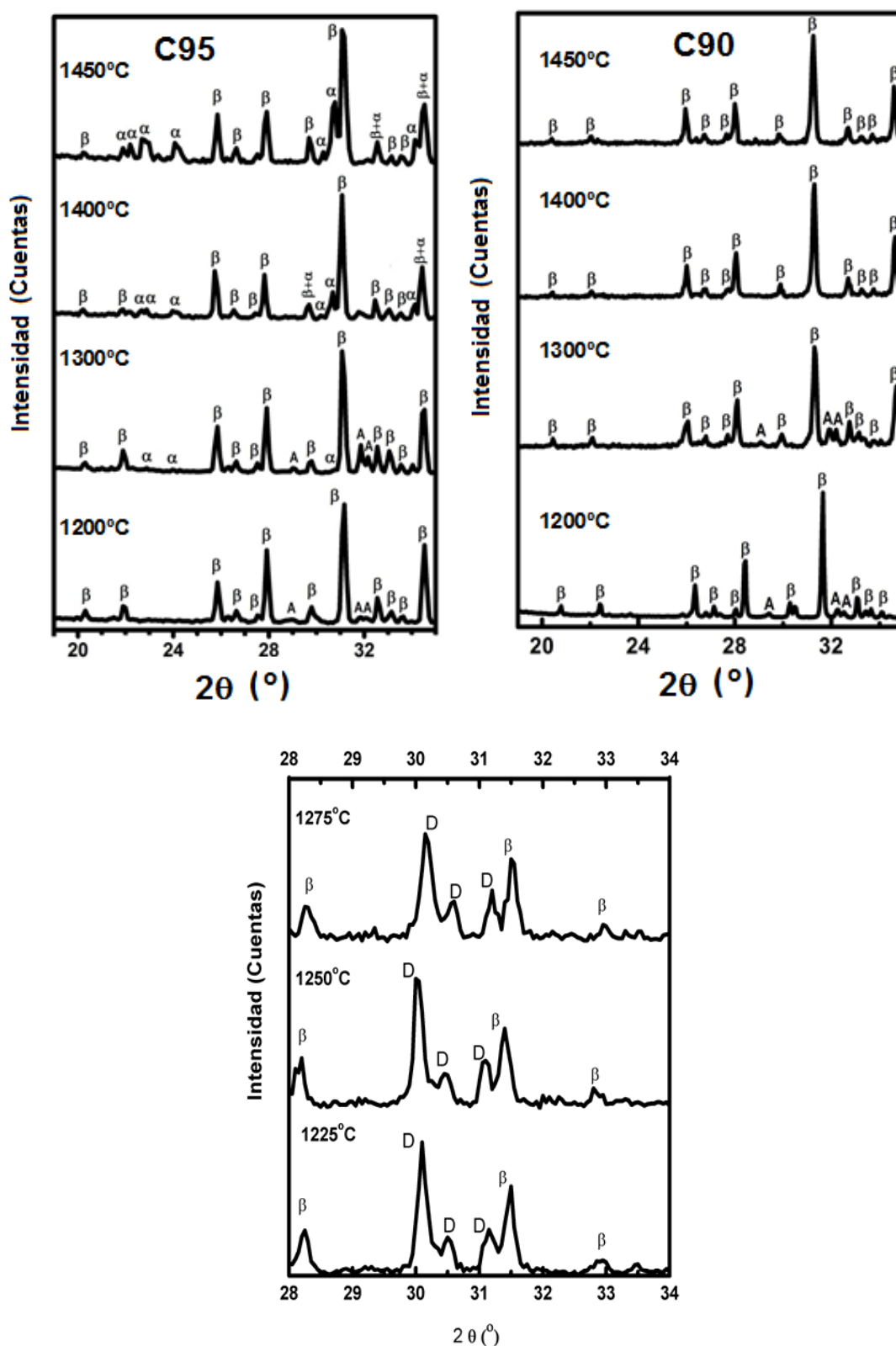
Puesto que las velocidades de sinterización alcanzan su máximo a 1310° y 1280°C para los compactos C95 y C90 respectivamente, se plantearon tratamientos isotérmicos en el intervalo de temperatura de 1100-1450 ° C por cuatro horas con el fin de optimizar el ciclo térmico para la sinterización.

Mediante estudios preliminares se determinó que la transformación  $\alpha \rightarrow \beta$  está fuertemente afectada por la velocidad de enfriamiento. En las muestras C95, a velocidades de enfriamiento de 5 y 2 ° C•min<sup>-1</sup> se obtuvo transformación completa a fase  $\beta$ , mientras que a 10°C•min<sup>-1</sup> se obtiene una mezcla de  $\alpha + \beta$ . Así, para los tratamientos isotérmicos de las composiciones C90 y C95, la velocidad de enfriamiento se fijó en 10°C•min<sup>-1</sup> con el fin de mantener la transformación  $\alpha \rightarrow \beta$  lo más baja posible. No se utilizaron velocidades de enfriamiento mayores porque, en general, no son adecuadas para la fabricación de piezas cerámicas. En el caso de C40 como no existe problemas de transformaciones de fase, la velocidad de enfriamiento usada fue de 5°C•min<sup>-1</sup>. Como se describe en la parte experimental, los tratamientos donde se usó carbonato de calcio como materia prima incluyen un palier isotérmico de una hora a 800°C para su descomposición, la velocidad de calentamiento fue de 5 °C • min<sup>-1</sup>.

En general, para materiales de fosfato tricálcico de alta pureza la transformación  $\alpha \rightarrow \beta$  ( $T \approx 1125 \pm 5^\circ\text{C}$ ) no ocurre durante el enfriamiento cuando se usan velocidades típicas para la fabricación de materiales. La diferencia encontrada en este trabajo está relacionada con la presencia de Si y Mg en su estructura cristalina ( $\text{Ca}_{3-x}\text{Mg}_x(\text{P}_{1-\delta}\text{Si}_\delta\text{O}_4)_2$ ).

En la Figura 6.4 se presentan los difractogramas correspondientes a los diferentes materiales sinterizados. Como se esperaba, las muestras C40 tratadas entre 1225 y 1275°C están constituidas por  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ . Las fases cristalinas  $\alpha$  y  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  presentes inicialmente en el polvo de fosfato tricálcico calcinado a 1300°C, reaccionan parcialmente con los granos de dióxido, durante la sinterización, transformándose en  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y dando la misma relación de fases cristalinas en las tres muestras tratadas térmicamente.





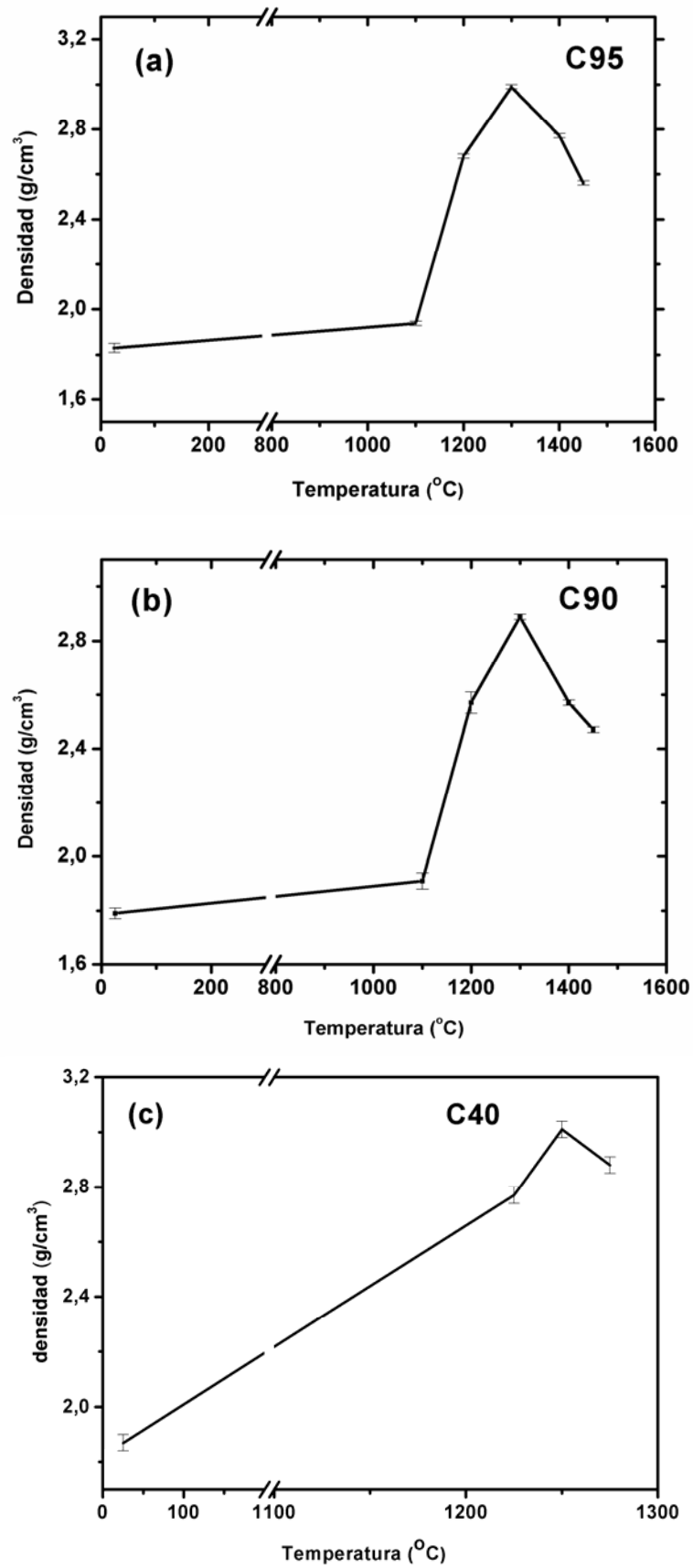
**Figura 6.4** Difractogramas de las muestras sinterizadas por 4 horas a las temperaturas indicadas. Muestras a) C95, b) C90 y c) C40.  $\beta$ :  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF 09-0169);  $\alpha$ :  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF 09-0348); CMS<sub>2</sub>:  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  (PDF 86-0932). A:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}$  (PDF 09-0432).

Todas las muestras de C90 entre 1100 y 1450°C y las de C95 a 1100 y 1200°C están constituidas por  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , en las muestras de C95 tratadas a  $T \approx 1300\text{-}1450^\circ\text{C}$  aparece  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  como una fase secundaria. El hecho de que  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sea la fase cristalina mayoritaria en las muestras de C95 tratadas a 1450°C, temperatura para la cual la composición C95 está localizada en la región monofásica  $\alpha$  (Figura 4.9) demuestra que, para una velocidad de enfriamiento relativamente baja ( $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ) necesaria para obtener piezas cerámicas sin defectos de enfriamiento, ocurre la transformación  $\alpha \rightarrow \beta$ . En la muestra de C95 tratada a 1300°C solo se detectaron trazas de  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , mientras que a 1400 y 1450°C se detectaron cantidades más altas de  $\alpha$ , lo que está de acuerdo con lo esperado según el diagrama de fases.

En las muestras de las tres composiciones tratadas a temperaturas menores a 1300°C se detectaron trazas de apatita. Si solo se consideran las fases de equilibrio, a una presión parcial de agua cero, no se espera la presencia de apatita, Figura 6.4. Sin embargo, el diagrama de equilibrio  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5\text{-H}_2\text{O}$ , ver Figura 5.15 indica que la hidroxiapatita  $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$  con una composición de 55% en peso de CaO es un compuesto estable a una presión parcial de agua suficiente. Los resultados obtenidos en los difractogramas mostrados en la Figura 6.4, demuestran que la hidroxiapatita es estable hasta temperaturas de 1300°C en las condiciones experimentales usadas.

A pesar que las contracciones totales alcanzada en las muestras C90 y C95 a 1400 y 1450°C durante los experimentos de velocidad de calentamiento constante fueron similares (C95) o incluso mayores (C90) que los alcanzados a 1300 ° C, la densidad aparente máxima, para las dos composiciones (Figura 6.5, Tabla 6.4) se obtuvo en las muestras sinterizadas a 1300°C/4h. Las máximas diferencias entre las densidades que se producen en las dos composiciones ( $\approx 15\%$  entre 1300 y 1450 ° C), no puede estar relacionado con los cambios polimórficos de fosfato tricálcico, ya que en las muestras de C90 sólo está presente la fase  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . La única característica coincidente de ambas composiciones es la ausencia de las trazas de apatita en los materiales sinterizados a 1400 y 1450 ° C (Figura 6.4). Este hecho se discutirá después cuando se describan las características microestructurales.

En el mismo sentido se tiene que en la muestra C40 aunque la contracción total continua aumentando hasta 1280°C, la densidad aparente obtenida a 1275°C fue menor que en la muestra sinterizada a 1250°C/4h.



**Figura 6.5.** Densidad aparente como una función de la temperatura para los materiales estudiados. a) C95, b) C90 y c) C40.

### 6.3.2 Características microestructurales

Las Figuras 6.7 a 6.14 muestran las microestructuras típicas de superficies pulidas y atacadas químicamente de las muestras obtenidas después de la sinterización a diferentes temperaturas.

#### 6.3.2.1 Microestructura de las muestras C90 y C95

Teniendo en cuenta la relativa similitud de las microestructuras de las muestras de las composiciones en la zona rica en fosfato tricálcico, C90 y C95, serán estudiadas simultáneamente.

No fue posible diferenciar características microestructurales específicas en las superficies pulidas y de fractura de las muestras C90 y C95 tratadas a 1200°C. Solo se pudo diferenciar una fase continua gris que presenta fractura intergranular (diámetro <5µm) rodeada de poros, tal como se observa en la Figura 6.6.

La microestructura de la muestra C95, sinterizada a 1250°C/4h, está formada por granos densos de C<sub>3</sub>P con un tamaño <1µm. A aumentos intermedios se observa la presencia de agregados redondeados densos y homogéneamente dispersos, con un tamaño <5 µm, y con una textura formada por un corazón de color gris oscuro que según los microanálisis por MEB-EDE están formados por silicofosfatos de calcio (Figura 6.7a). La Figura 6.7b muestra una ampliación de uno de estos agregados, según los datos de DRX y MEB-EDE, la corteza de estos agregados podría corresponder a Si-Ap “en no equilibrio” formados por reacción entre la sílice amorfa y el fosfato tricálcico utilizados como materias primas.

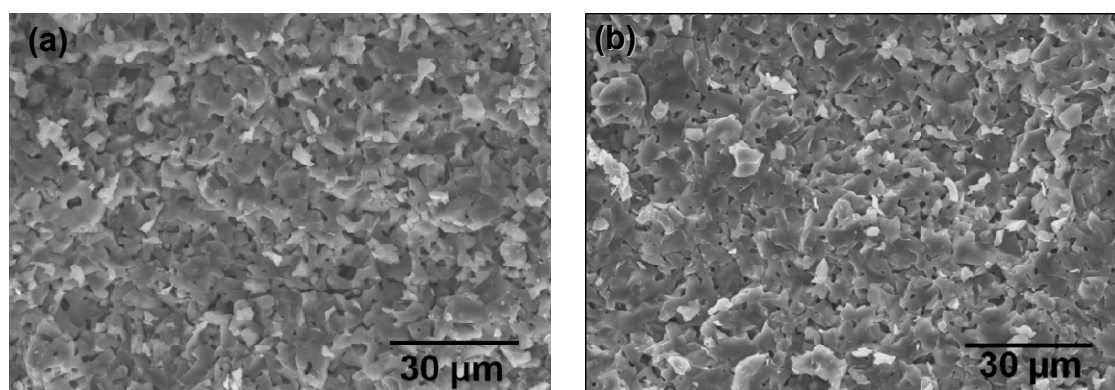


La formación de estas apatitas y fases amorfas transitorias aumentará el transporte de masa y facilitará el proceso de sinterización.

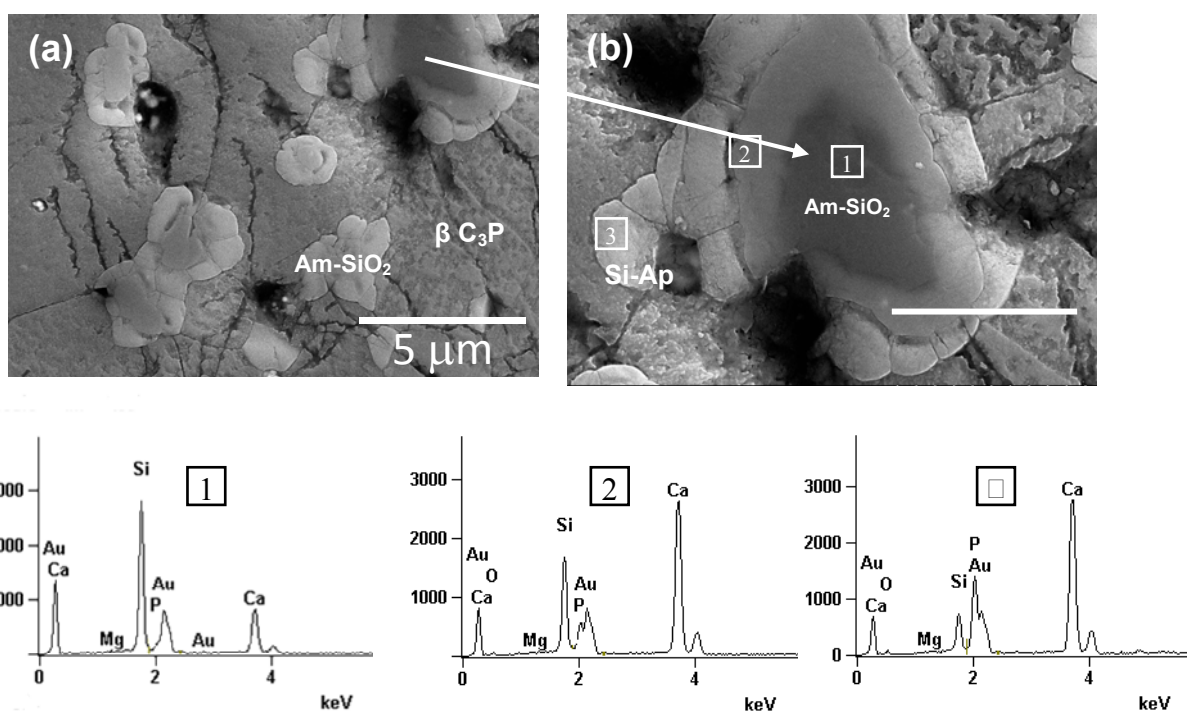
Durante el proceso de sinterización reactiva (SR) también han tenido lugar reacciones entre el C<sub>3</sub>P y el MgO del tipo:



Ahora bien el pequeño tamaño de partícula del MgO utilizado en la formulación de las composiciones ha facilitado una reacción total por lo que no se han observado segregaciones asociadas a granos de MgO.



**Figura 6.6.** Características microestructurales de muestras sinterizadas a 1200°C. Microfotografías de CFE-SEM de superficies de fractura. a) C90, b) C95.



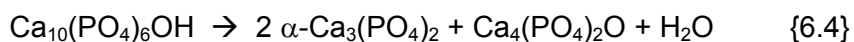
**Figura 6.7.** Microestructuras características de la muestras C95 sinterizada a 1250°C. Microfotografías CFE-SEM de muestras pulidas y atacadas químicamente y microanálisis por MEB-ED. La fase mayoritaria continua es  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Las partículas son silicofosfatos de calcio producto de la sinterización reactiva.

La microestructura de las dos series de muestras sinterizadas a 1300°C/4h está constituida por una fase continua (gris en las micrografías de MEB-EC, Fig. 6.8), que fue identificada como  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  en acuerdo con los análisis de DRX (Fig. 6.4). En C90 se observa la presencia de granos de un color gris más oscuro que se atribuyen a silicofosfatos de calcio detectadas en las muestras sinterizadas a 1250°C/4h que teniendo en cuenta los DRX se atribuyen a fases de tipo apatita con sílice.

La determinación del tamaño de grano en las superficies atacadas térmicamente da resultados similares en ambas composiciones (tamaño promedio  $8 \pm 4 \mu\text{m}$ ). En las muestras C95 tratadas a  $1300^\circ\text{C}$  se diferenciaron regiones de  $\approx 25 \mu\text{m}$  en las cuales tiene lugar un ataque químico más efectivo. Estas regiones, con composiciones similares a la matriz MEB-EDE (Fig. 6.8) fueron identificados como la fase secundaria,  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , detectada por DRX (Fig 6.4). En los bordes de grano y puntos triples de los granos de  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  de C95 y C90 se encontraron áreas de color gris oscuro y tamaños menores que  $2 \mu\text{m}$  y con un nivel de ataque similar a la matriz. Aunque no fue posible analizar su composición, pueden estar asociados a las trazas de fases líquidas que han podido facilitar la densificación de estos materiales.

Para temperaturas de sinterización superiores a  $1300^\circ\text{C}$  las dos series de materiales presentan dos microestructuras diferentes, como se observa en las Figuras 6.9 a 6.12. En las muestras C95 y C90 sinterizadas a  $1400$  y  $1450^\circ\text{C}$ , se observan grandes poros elongados alrededor de las áreas grises claras mientras que han desaparecido las zonas ricas en sílice, presentes en las muestras sinterizadas a  $1300^\circ\text{C}$ . Estos poros se reflejaron en la significativa disminución de la densidad como se describe en la Figura 6.5. El origen de esta porosidad similar en ambos materiales debería estar relacionada con cambios o reacciones ocurridas en ambas series de materiales, tal como la descomposición de la apatita.

Como se describió anteriormente, a la presión parcial de agua del laboratorio, la hidroxiapatita es estable hasta  $1300^\circ\text{C}$  como se observó por DRX. A temperaturas mayores a  $1300^\circ\text{C}$  ocurre la siguiente reacción de descomposición:

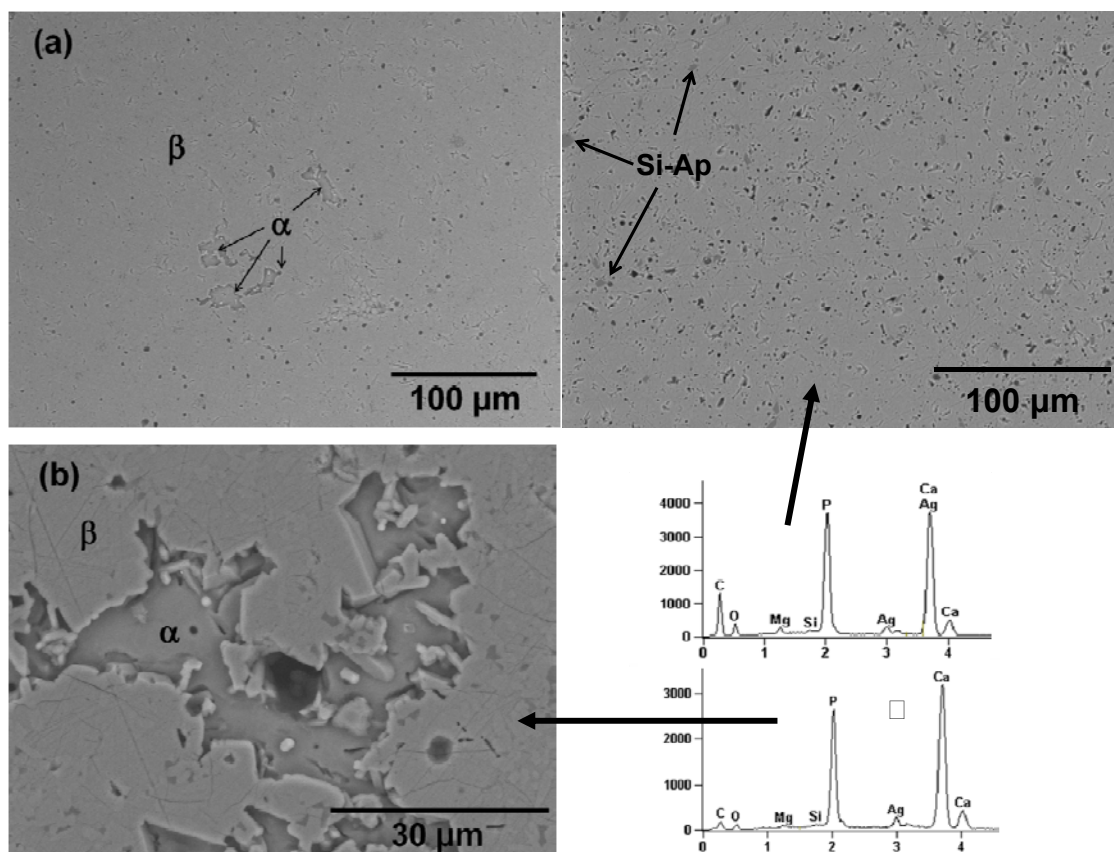


Una vez es eliminada el agua, la pérdida de masa asociada puede ser de 1,79% y la correspondiente disminución de volumen de 5,5%.

Las pequeñas cantidades de  $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2$  predichas por esta reacción en el material no son detectadas debido a su baja concentración y la coincidencia de la mayoría de picos con los de la apatita.

Además de la variación de volumen debida a la descomposición de la apatita, la salida del vapor de agua a través de la mayor parte del material a altas temperaturas produce un aumento de porosidad adicional que puede ser identificada con la porosidad

alargada observada en las muestras sinterizadas a 1400 y 1450°C (Figuras 6.9 a 6.12). Este proceso debe ocurrir también en las pequeñas ( $\approx 8$ -10 mm) piezas utilizadas para el estudio de sinterización dinámica, sin embargo, no tiene un efecto significativo en la contracción (Figura. 6.3).

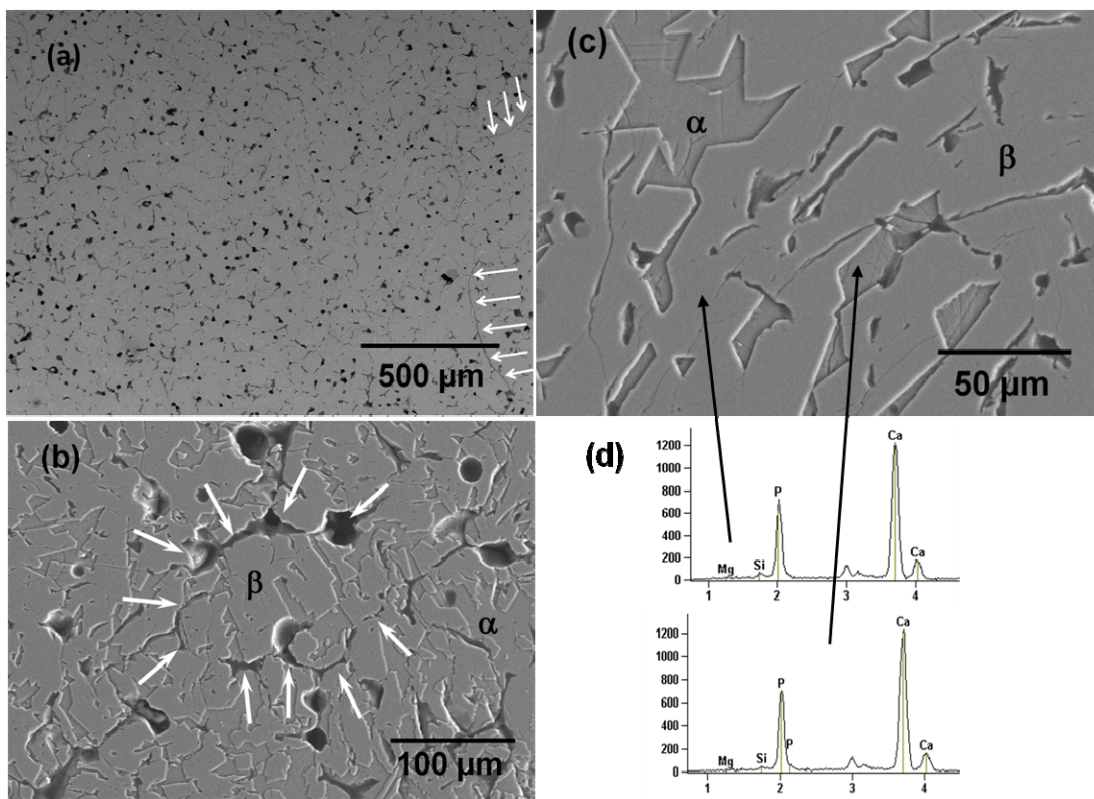


**Figura 6.8.** Microestructuras características de la muestras C90 y C95 sinterizadas a 1300°C. Microfotografías CFE-SEM de muestras pulidas y atacadas químicamente y análisis de EDS. La fase mayoritaria continua (gris claro) es  $\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Las partículas más oscuras pueden corresponder con las pequeñas cantidades de Si-apatita detectadas por DRX. a) En la muestra C95 se observan las partículas de  $\alpha$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  debido a que son atacadas más severamente que la matriz. b) Muestra C95. Detalle de las partículas de  $\alpha$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . c) Muestra C90. No se observa  $\alpha$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . d) Microanálisis por MEB-EDE del  $\text{C}_3\text{Pss}$  presente en las muestras.

Adicionalmente a la presencia de poros elongados, la microestructura de C95 tratada a 1400°C y 1450°C a bajos aumentos (Figuras 6.9 y 6.10) presentan más similitudes. Ambas están formadas por grandes zonas grises claras ( $>100\mu\text{m}$ ) de diferentes formas y tamaños y poros (negros) los cuales son más grandes en las muestras



tratadas a 1450°C. Se observaron algunas grietas grandes (mayores a 500µm) en las muestras C95 sinterizadas a 1400°C (Figura 6.9).



**Figura 6.9.** Características microestructurales de las muestras C95 sinterizadas a 1400°C. Superficies pulidas y atacadas químicamente. a) SEM de bajos aumentos, b) y c) CFE-SEM de altos aumentos, y d) microanálisis de SEM-EDS.

Una observación más cercana de las zonas grises claras (Figuras 6.9 y 6.10) revela características microestructurales muy diferentes. En las muestras sinterizadas a 1400°C (Figura 6.9) estas zonas están constituidas por partículas de  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss (DRX, fig 6.4). formando una matriz continua y áreas pequeñas con un mayor ataque que fueron identificadas como la fase secundaria,  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss (DRX, Figura 6.4).

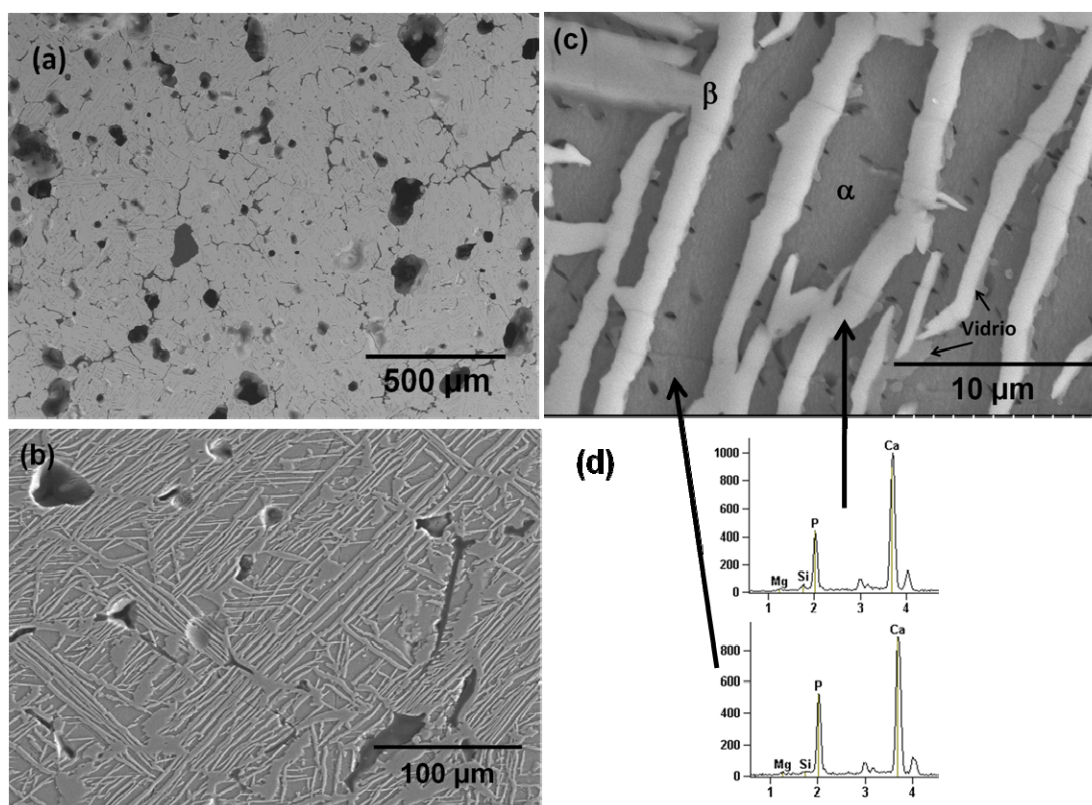
Los límites de grano entre las fases  $\alpha$  y  $\beta$  son rectos y no se detectaron fases secundarias que pueden estar asociadas con vidrio (Figura 6.9). Esta clase de microestructura podría desarrollarse durante la sinterización, por la transformación parcial de la fase de baja temperatura  $\beta$  en  $\alpha$ . Las grietas grandes observadas en estos especímenes (Figura 6.9(a)) fueron probablemente originados por el esfuerzo debido a la diferencia en expansión térmica entre las dos fases y entre los cristales de la fase más anisotrópica  $\alpha$  (Tabla 6.3).



**Tabla 6.3.** Características de expansión térmica de las fases de fosfato tricálcico y dióxido.

	Coeficiente de dilatación* $_{500-1000^{\circ}\text{C}}$ ( $\times 10^{-6} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ )			
	Medio	$\alpha_a$	$\alpha_b$	$\alpha_c$
$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ <sup>11</sup>	20,2	11,71	37,35	-
$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ <sup>12</sup>	7,8	6,17	17,08	0,24
$\text{Ca}(\text{MgSiO}_3)_2$ <sup>13</sup>	10,7	6,01	18,73	7,36

\*Los valores de los coeficientes de dilatación se han calculado teniendo en cuenta la variación de los parámetros con la temperatura para cada una de las fases.



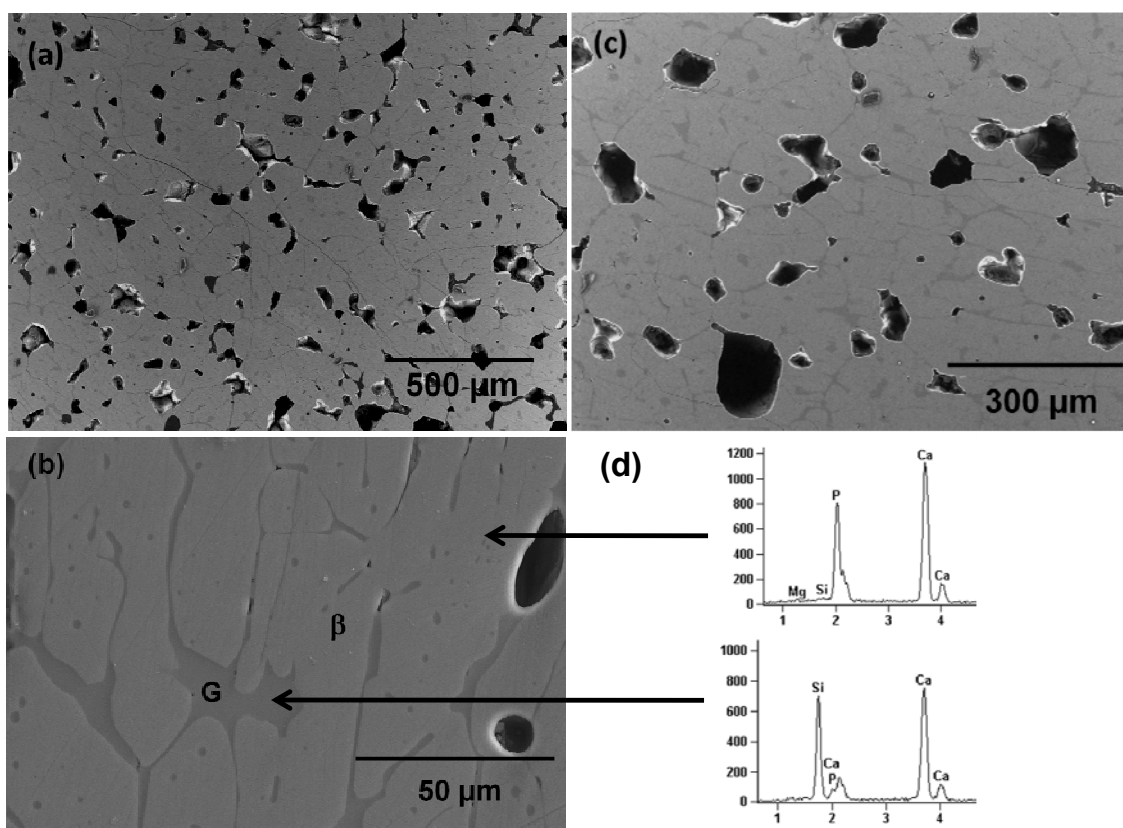
**Figura 6.10.** Características microestructurales de muestras C95 sinterizadas a 1450°C. Superficies pulidas y atacadas químicamente. a) Imagen SEM de bajos aumentos, b) y c) imágenes CFE-SEM de altos aumentos, d) microanálisis de SEM-EDS de las características señaladas en c)

La microestructura de las muestras tratadas a 1450°C (Figura 6.10) está constituida por placas fuertemente orientadas con relación de aspecto (4:80 micrones) de  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss dispersos en una matriz de  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss. Se detectan pequeñas cantidades de vidrio en los bordes de grano entre las fases  $\alpha$  y  $\beta$ . Esta especial microestructura desarrollada por la composición hiperperitética C95, con un exceso de  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , se puede explicar en términos de la reacción peritética desarrollada

durante el enfriamiento a temperaturas superiores a 1440°C (Figura 4.9), por parte del  $\alpha$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss y la fase líquida dando  $\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss. Entonces, la microestructura resultante se formaría según la reacción:



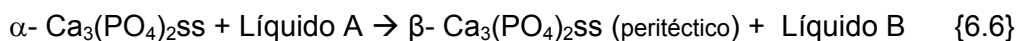
Como ocurrió en las muestras C95, las microestructuras de C90 calentadas a 1400 y 1450°C a bajos aumentos (Fig 6.11 y 6.12) están formadas por zonas grises claras (>100 $\mu\text{m}$ ) de formas y tamaños diferentes, grandes poros redondos y alargados. Sin embargo se han detectado, por SEM-EDE, cantidades significativas de vidrio alrededor y dentro de las áreas grises claras en las muestras de C90 (Figura 6.11 ).



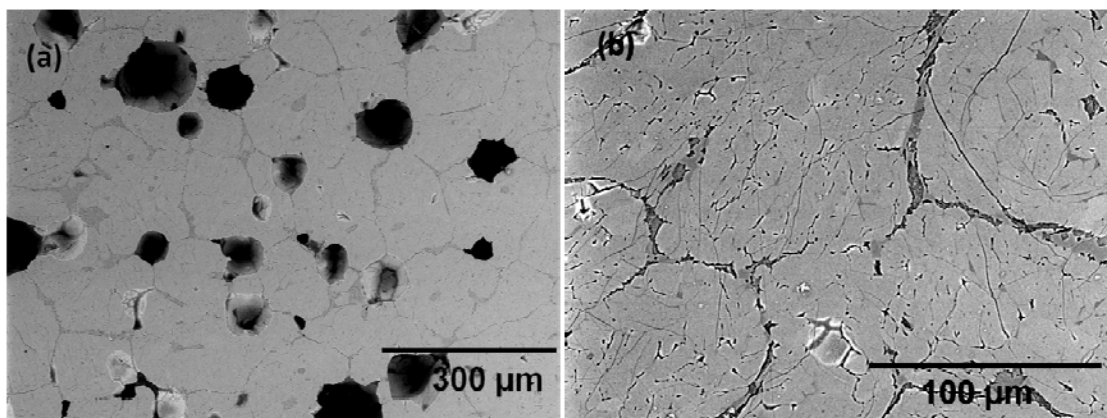
**Figura 6.11.** Características microestructurales de muestras C90 sinterizadas a 1400°C. Superficies pulidas y atacadas químicamente. a) Imagen SEM de bajos aumentos, b) y c) imágenes CFE-SEM de altos aumentos, d) microanálisis por MEB-EDE de las características señaladas en b. (G: Vidrio)

Para las muestras sinterizadas a 1400°C, estas características microestructurales corresponden a la microestructura de equilibrio de la composición considerada a la

temperatura de sinterización formada por  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss y líquido que moja los granos de fosfato. Por contrario, la distribución de fases en equilibrio para esta composición hipoperitética, con un exceso de líquido a 1450°C (Figura 6.12), está formada por  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss + líquido y a 1440°C sufrirá la reacción peritética:



Hasta conversión completa de  $\alpha$  en  $\beta$ , las muestras C90 no presentan una microestructura especial tal como la formada por C95 (Figura 6.10)

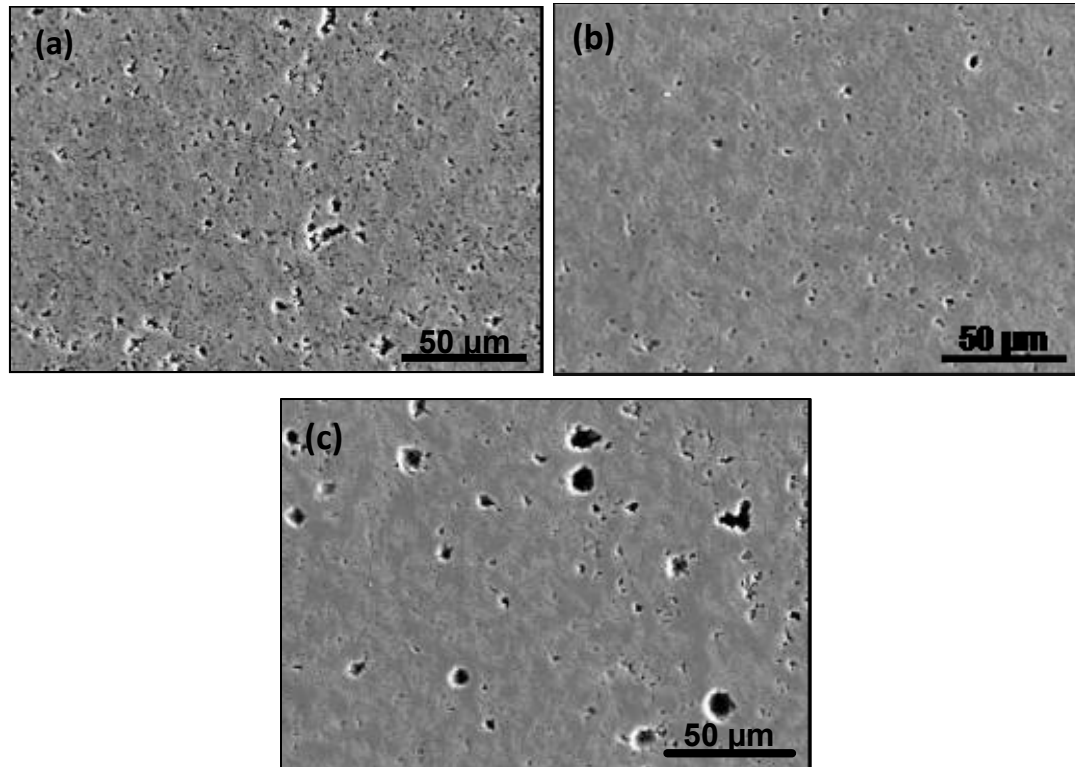


**Figura 6.12.** Características microestructurales de muestras C90 sinterizadas a 1450°C. Superficies pulidas y atacadas químicamente. a) Imagen SEM de bajos aumentos, b) imágenes CFE-SEM de altos aumentos.

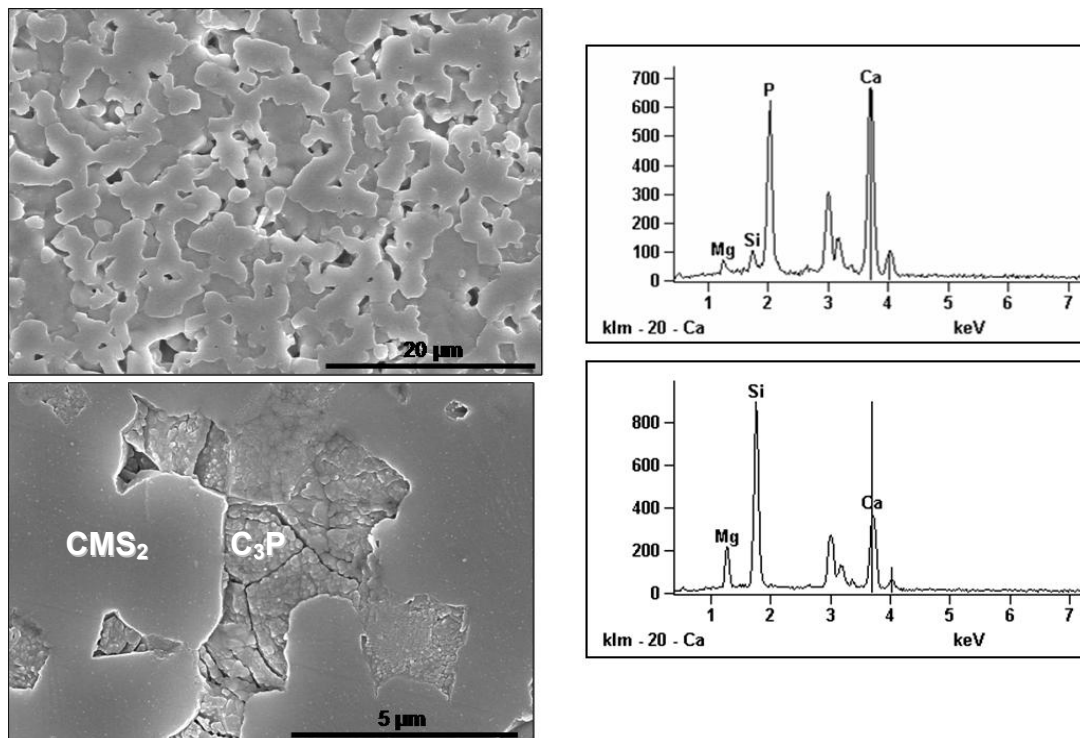
### 6.3.2.2 Microestructura de la muestras de composición C40

Las Figuras 6.13 y 6.14 muestran las microestructuras típicas, de superficies pulidas y atacadas químicamente, de la composición C40, después de tratamiento térmico a diferentes temperaturas. El área atacada corresponde a la fase  $\beta$ - $\text{C}_3\text{P}$  soluble en ácido acético mientras que el dióxido es más insoluble.

Las microestructuras de las tres muestras estudiadas están constituidas por dos fases cristalinas, fosfato tricálcico y dióxido como se determinó por microanálisis de MEB-EDE y DRX. El tamaño de poro es más pequeño en las muestras sinterizadas a 1250°C ( $\sim 4 \mu\text{m}$ , Figuras 6.13b y 6.14), intermedio para las muestras tratadas a 1200°C ( $\sim 6 \mu\text{m}$ , Figura 6.13a) y mayor para las sinterizadas a 1275°C ( $\sim 10 \mu\text{m}$ , Figura 6.13c). Estos resultados son consistentes con la tendencia observada en la curva de sinterización, Figura 6.5, en la cual la muestra sinterizada por 4h a 1250°C fue la de mayor densidad ( $\rho/\rho_{\text{teór.}} \approx 95 \%$ ).



**Figura 6.13.** Microfotografías CFE-SEM de baja magnificación de superficies pulidas y atacadas químicamente de muestras C40 sinterizadas a: (a) 1225, (b) 1250 y (c) 1275°C.



**Figura 6.14.** Características microestructurales de C40 sinterizada a 1250°C. Microfotografías de superficie pulida. Se presentan los microanálisis por MEB-EDE.

La Figura 6.14 muestra la microestructura típica de la muestra sinterizada 4 horas a 1250°C, en la cual se pueden observar granos claros de dióxido, con tamaños de ~ 6 µm, en una matriz continua formada por granos grises con varias grietas, 3-4 µm de longitud, en los límites de grano de fosfato tricálcico.

Los resultados del microanálisis por MEB-EDE de los granos de fosfato tricálcico en el material sinterizado confirman la presencia de Mg y Si en solución sólida en el fosfato tricálcico ( $\beta\text{-Ca}_{3-x}\text{Mg}_x(\text{P}_{1-\delta}\text{Si}_\delta\text{O}_4)_2$ ). Al nivel de resolución empleado no se ha detectado la presencia de fases líquidas (vídrios) en los bordes de grano y puntos triples en ninguna muestras estudiadas.

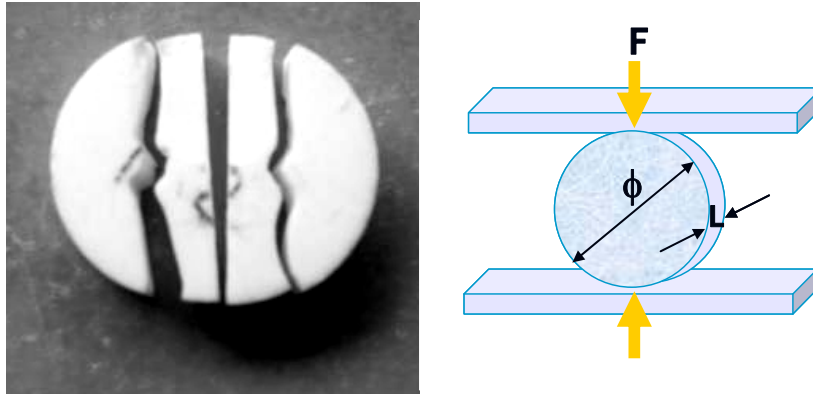
Teniendo en cuenta los resultados de los párrafos anteriores, la muestra C40 sinterizada a 1250°C con una baja porosidad y tamaño de poro pequeño fue seleccionada para realizar el estudio mecánico.

### **6.3.3 Caracterización mecánica**

#### **6.3.3.1 Ensayos de compresión diametral**

En las muestras en forma de disco el esfuerzo a tracción desarrollado durante el ensayo es más alto y uniforme en el plano diametral, mientras que las zonas más próximas a la soportes, que transfieren la carga, soportan esfuerzos a compresión. La proporción de probeta a compresión es menor para las probetas con mayor rigidez. El aspecto de las muestras, después de ensayos válidos, se muestra en la Figura 6.15. La rotura/falla inicial de las probetas se produce a través del plano diametral, la muestra comienza a dividirse en dos piezas similares al inicio de la primera pérdida de carga en la curva de fuerza-desplazamiento registrada durante el experimento. Tras el fallo inicial, las dos partes siguen en compresión hasta que fallan nuevamente, lo que lleva a una segunda caída de la carga. La carga máxima después de la primera caída se ha utilizado para calcular la resistencia a la compresión diametral.

Los parámetros de Weibull calculados usando los datos correspondientes a las medidas válidas se resumen en la Tabla 6.4. Las distribuciones acumuladas calculadas con los datos en la Tabla 6.4 se han representado en la Figura 6.16, junto con los datos experimentales. Las figuras 6.6 y 6.17 a 6.19 muestran las superficies de fractura características de las probetas ensayadas. Las figuras 6.18a, c y e y las 6.19a, c y e muestran las micrografías de las superficies de fractura a bajos aumentos de las probetas estudiadas.



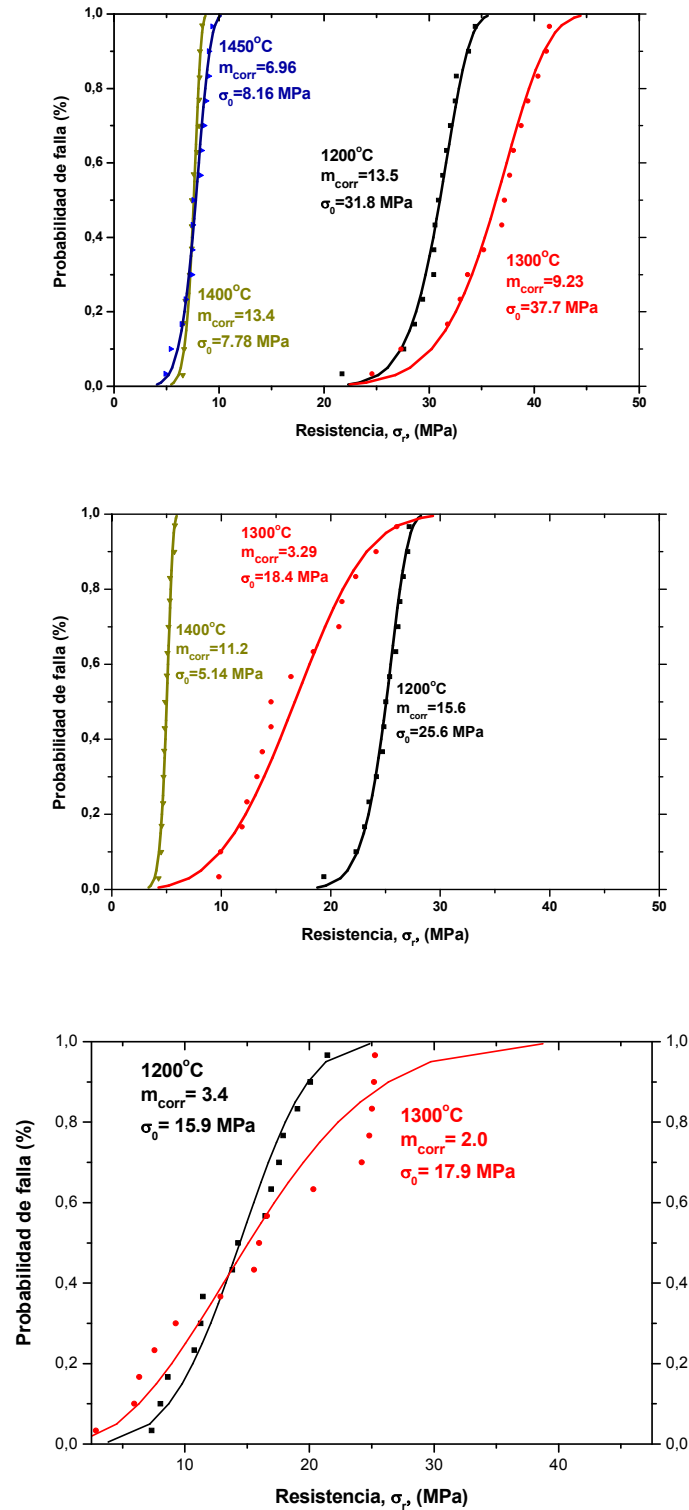
**Figura 6.15.** Prueba de compresión diametral de discos. Disposición de probetas y carga y patrón de fractura.

No se han identificado defectos singulares que actúen como defectos críticos. El aspecto de las superficies de fractura, sin zonas de fractura plana, revela que la fractura se produjo por la unión de los defectos y no por la propagación de un defecto singular. A pesar que la fractura no se produjo por defectos críticos, existe un buen acuerdo entre los datos experimentales y la distribución monomodal calculada con un 90% de límite de confianza, al igual que ocurre en otros materiales que no presentan defectos críticos como los que tienen microestructuras secundarias y/o tensiones residuales.

La fractura es más tortuosa a medida que aumenta el tamaño de grano y de poro de los materiales como corresponde a una fractura por coalescencia o por defectos microestructurales. De hecho, se observan múltiples planos de grietas y microgrietas que rodean y atraviesan los granos y los poros en las superficies de fractura (Figuras 6.18d y f y 6.19 d, e) de las muestras sinterizadas a 1400 y 1450°C, las cuales presentan los valores mas altos de los parámetros microestructurales (Figuras 6.9, 6.10 y 6.11). Como consecuencia, los valores de resistencia de estas muestras son mucho más bajos que los de las muestras sinterizadas a temperaturas más bajas, con microestructura más fina (Figuras 6.8 y 6.9). Este hecho se cuantifica en los valores de las resistencias características, los cuales fueron significativamente menores para un nivel de confianza del 90% en las muestras sinterizadas a alta temperatura (Tabla 6.4). Los valores son similares para las muestras C90 sinterizadas a 1400 y 1450°C y levemente más bajos para C90 sinterizado a 1400°C. No hay diferencias significativas entre los módulos de Weibull de las composiciones sinterizadas a 1400°C, mientras que el valor de C95 sinterizado a 1450°C fue ligeramente inferior.

**Tabla 6.4** Características microestructurales y parámetros de distribución de Weibull para los materiales estudiados.  $D_u$  = 90% Límite Superior;  $D_l$  = 90% Límite inferior;  $C_l$  = 90% Límite inferior;  $C_u$  = 90% Límite inferior, m (corregido)= no sesgado.

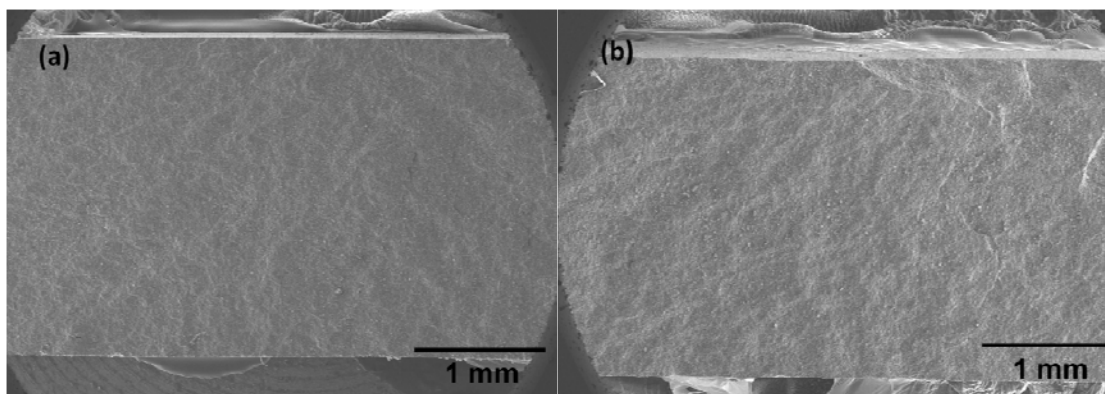
	Temperatura	Fases identificadas	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	Módulo de Weibull (m)				Resistencia característica (MPa)		
Composición	(°C)	DRX y SEM-EDS	(±0,02)	Calculado	Corregido	$D_u$	$D_l$	$\sigma_0$	$C_l$	$C_u$
C99	1200	$\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ +Ap	1,93	3,74	3,39	4,87	2,39	15,9	13,9	18,2
	1300	$\alpha$ + $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,66	2,16	1,96	2,81	1,38	17,9	14,2	22,7
C95	1200	$\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ +Ap	2,68	14,9	13,5	19,3	9,50	31,8	30,7	32,9
	1300	$\alpha$ + $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ +Ap	3,02	10,2	9,23	13,2	6,50	37,7	35,9	39,6
	1400	$\alpha$ + $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,76	14,8	13,4	19,2	9,44	7,78	7,52	8,05
	1450	$\alpha$ + $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,67	7,66	6,96	9,95	4,90	8,16	7,65	8,72
C90	1200	$\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ +Ap	2,57	17,1	15,6	22,2	11,0	25,6	24,9	26,4
	1300	$\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ +Ap	2,96	3,62	3,29	4,70	2,32	18,4	16,1	21,2
	1400	$\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2,77	12,3	11,2	16,0	7,87	5,14	4,94	5,36



**Figura 6.16.** Distribuciones de probabilidad de falla/rotura acumulada frente a la resistencia a la tracción diametral de las muestras sinterizadas a las temperaturas indicadas. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas a la distribución de Weibull calculada utilizando los valores de  $m$  y  $\sigma_0$  de la Tabla 6.4. a) muestras C95 y b) muestras C90 y c) muestras  $\beta$ -C<sub>3</sub>P=C99.

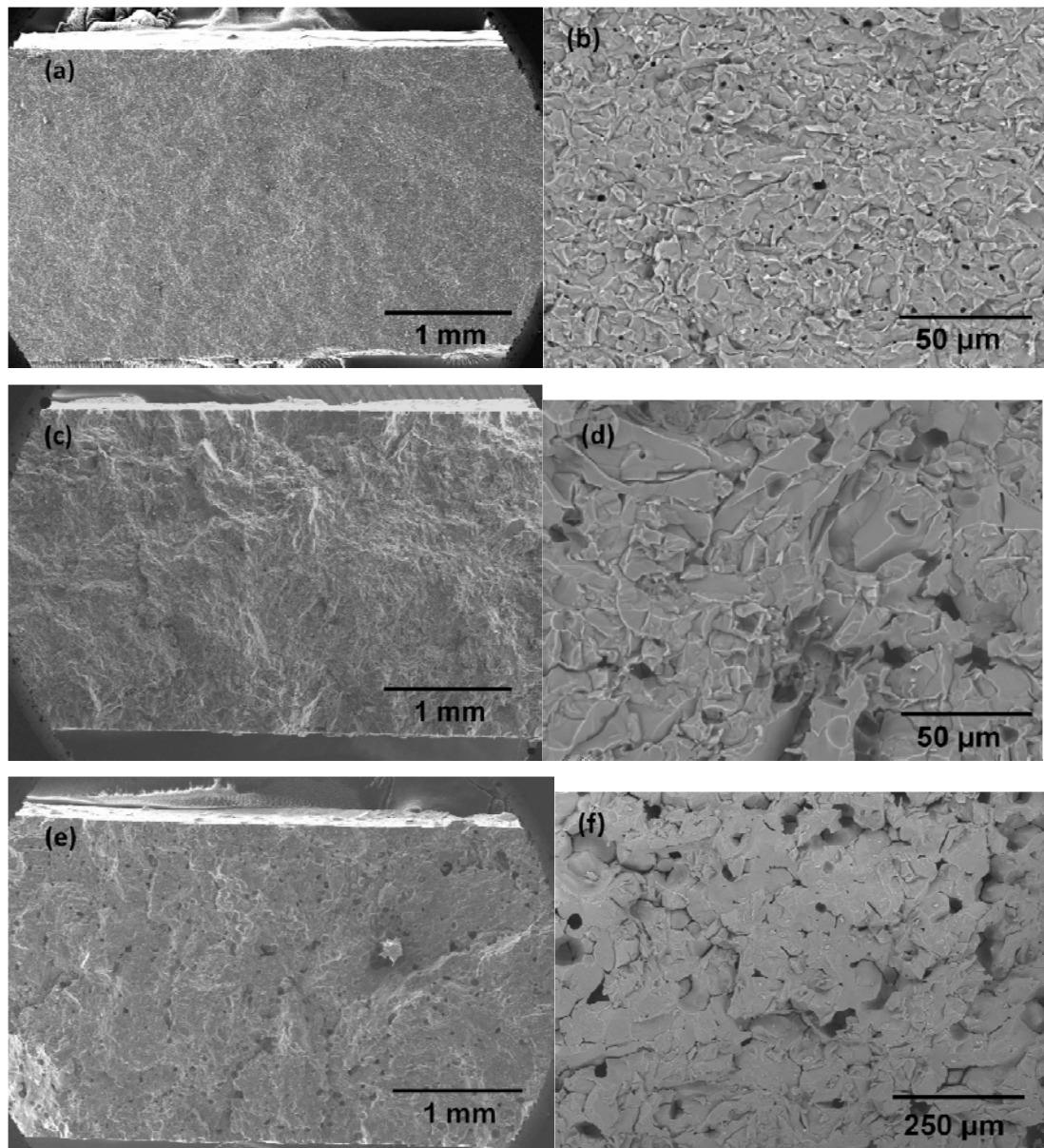


Por otra parte, no hubo diferencias significativas entre los valores de las muestras sinterizadas a 1200 y 1400 °C. Este hecho revela que el engrosamiento de la microestructura y la formación de poros alargados a 1400°C no afecta a la fiabilidad de los materiales a pesar de determinar el nivel de esfuerzo que pueden soportar. Los valores de módulo de Weibull obtenidos para los materiales sinterizados a 1200 y 1400 ° C (valores no sesgados  $\approx 11,2$  a  $13,5$ ) son relativamente altos para los materiales porosos estudiados.

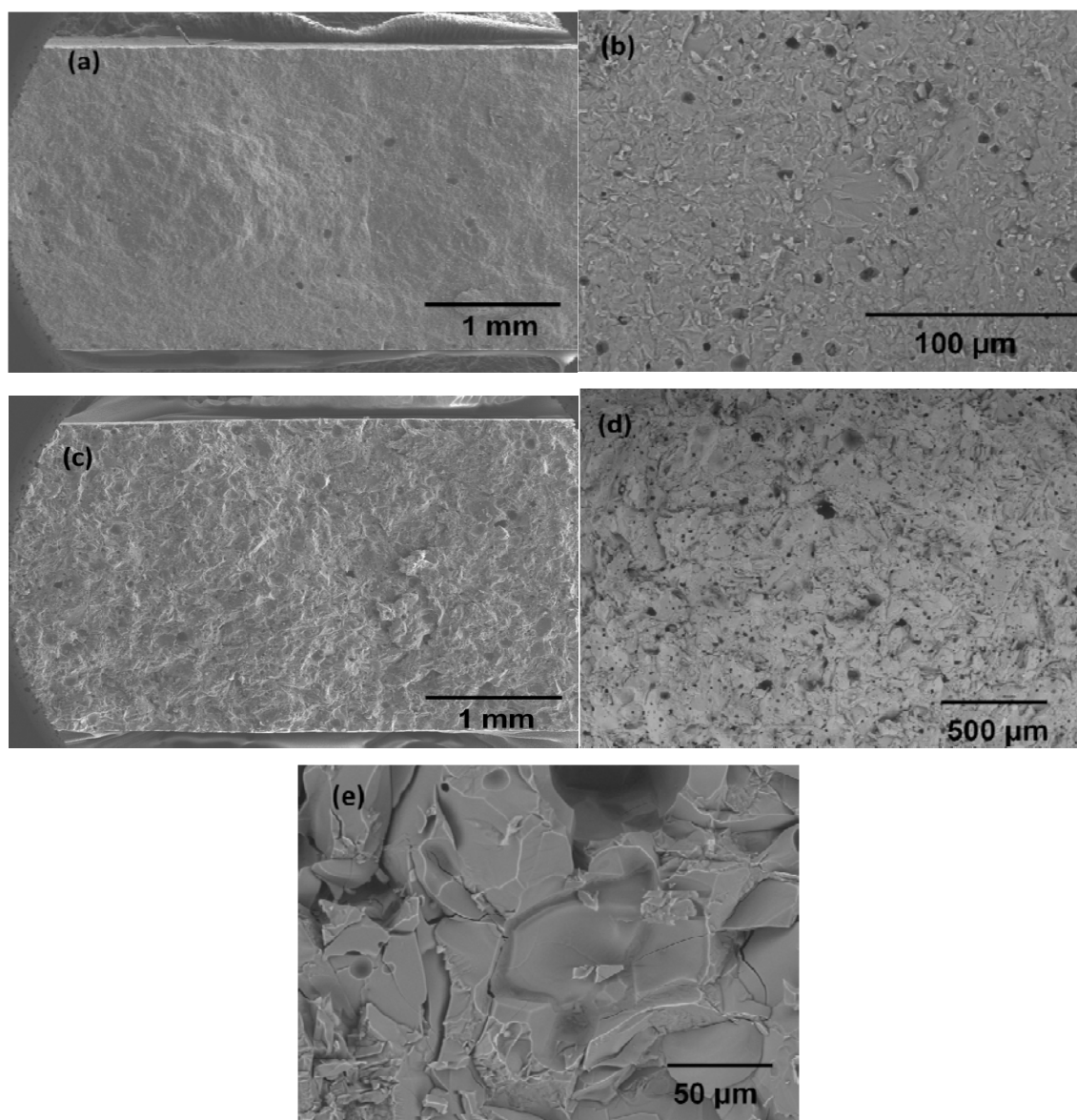


**Figura 6.17.** Microfotografías de MEB-EC a bajos aumentos de las superficies de fractura características de las muestras sinterizadas a 1200°C. No se observan defectos críticos. a) Muestras de C95 y b) Muestras de C90.

Las resistencias características del material C95 sinterizado a 1200 y 1300°C son estadísticamente diferentes a las del material C90, estas diferencias aumentan con la temperatura de sinterización. Como se observa en la Figura 6.6, las muestras C95 y C90 sinterizadas a 1200°C tienen microestructuras y modos de fractura similares, por lo tanto, los menores valores de resistencia de C90 se deben a la presencia de mayores cantidades de fases amorfas residuales como se ha mencionado anteriormente. Las valores determinados para la muestra C90 sinterizada a 1300°C se explican por la presencia de granos de  $C_3P$  con un crecimiento exagerado (ver las superficies de fractura de la muestra C90/1300°C, Fig. 6.19c). Los granos con un tamaño exagerado contribuyen a que la fractura esté determinada por un defecto crítico mayor. Por otra parte, el modo de fractura de las muestras monofásicas es transgranular lo que generalmente conduce a menores resistencias a la fractura. Las muestras bifásicas C95/1300°C con una microestructura más homogénea (Fig. 6.8 a y b) y fractura intergranular (Fig. 6.18 c) tienen un menor tamaño de defecto crítico aparente y una mayor resistencia. La considerable disminución del módulo de Weibull de estos ejemplares, debe estar relacionada con la presencia de grietas, como se observa en las superficies pulidas.



**Figura 6.18.** Micrografías de MEB-EC mostrando las superficies de fractura características de muestras C95. a) Muestra sinterizada a 1300°C. Microfotografía de bajos aumentos. No se observa un defecto crítico. b) Muestra sinterizada a 1300°C. Se observa fractura predominantemente intergranular. c) Muestra sinterizada a 1400°C. Microfotografía de bajos aumentos. No hay un defecto crítico, se observan grandes poros y fractura tortuosa. d) Muestra sinterizada a 1400°C. Se observan grandes poros y fractura predominantemente intergranular. e) Muestra sinterizada a 1450°C. Microfotografía de bajos aumentos. No hay un defecto crítico, se observan grandes poros y fractura tortuosa. f) Muestra sinterizada a 1450°C, se observan grandes poros y fractura predominantemente intergranular.



**Figura 6.19.** Micrografías de MEB-EC mostrando superficies de fractura características de muestras C90. a) Muestra sinterizada a 1300°C. Microfotografía a bajos aumentos. No hay un defecto crítico y se observan grandes poros. b) Muestra sinterizada a 1300°C. Se observa fractura predominantemente transgranular. c) Muestra sinterizada a 1400°C. Microfotografía a bajos aumentos. No hay un defecto crítico, se observan grandes poros y fractura tortuosa. d) Muestra sinterizada a 1400°C. Se observan numerosos poros grandes y fractura predominantemente transgranular. e) Muestra sinterizada a 1400°C. La comparación con la Figura 6.18d, a los mismos aumentos, muestra el extremo crecimiento microestructural en este material.

### 6.3.3.2 Resistencia a la flexión en tres puntos:

Aunque el ensayo de compresión diametral es más significativo que el de flexión en tres puntos, debido a que la región expuesta a tensión en el primero es un área (el área diametral transversal a la fuerza aplicada) mientras que en el de flexión solo es una línea (la línea inferior), se ha determinado el módulo de fractura en tres puntos para algunos materiales seleccionados con el fin de obtener valores de resistencia bajo un ensayo normalizado ( UNE-EN 843-1, 1996).

Los materiales seleccionados son: a) uno monofásico de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P (C95/1250°C/4h) y b) otro bifásico C<sub>3</sub>P-CMS<sub>2</sub> (C40/1250°C/4h).

El material de fosfato tricálcico C95 se seleccionó teniendo en cuenta los resultados del estudio de compresión diametral. La composición C95 se sinterizó a 1250°C, buscando un balance óptimo entre la resistencia característica y el módulo de Weibull.

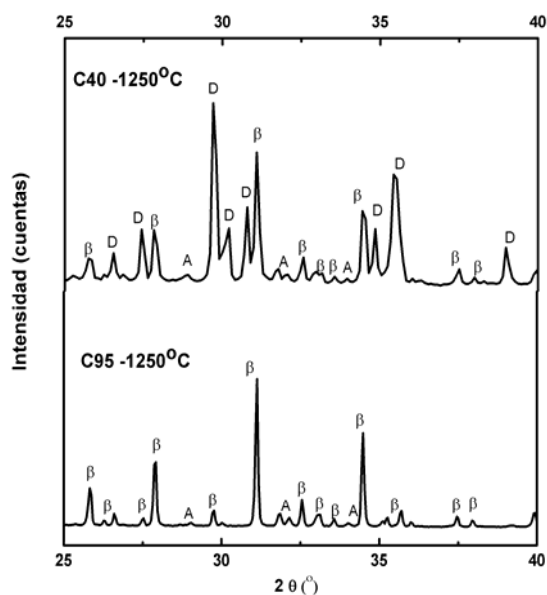
En el material de C<sub>3</sub>P-CMS<sub>2</sub> C40, con una composición muy próxima al eutéctico, no se ensayó en condiciones de compresión diametral ya que no presenta transformaciones de fase hasta la temperatura eutéctica, por tanto la selección de las condiciones de ensayo se basó en los resultados del estudio de densificación por MEB-EDE. La composición C40 se sinterizó a la temperatura de densificación óptima 1250°C.

En la Figura 6.20 se presentan los difractogramas correspondientes a las muestras sometidas a estos ensayos. En la muestra C95 sinterizada a 1250°C/4h la fase mayoritaria es  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, se detecta la presencia de indicios de una fase de tipo apatítico por DRX. La muestra C40 sinterizada a 1250°C/4h está compuesta por dióxido y  $\beta$ -C<sub>3</sub>Pss, también observan indicios de una fase de tipo apatítico.

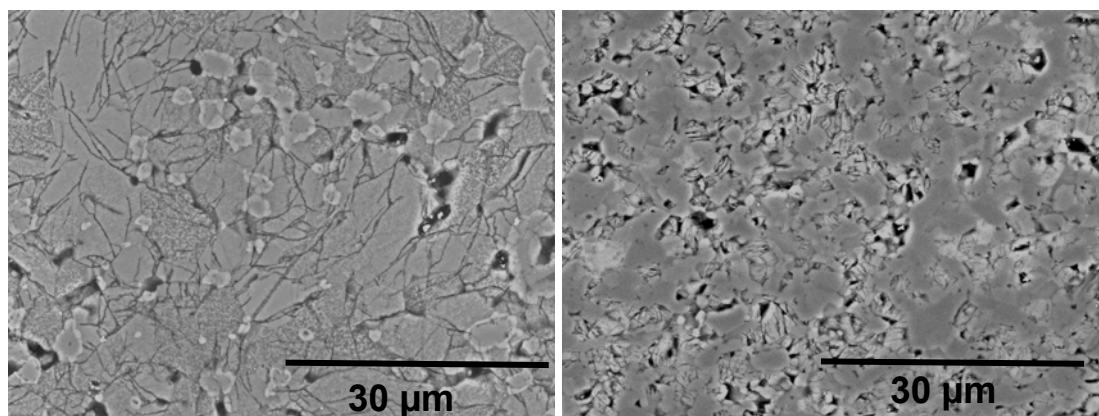
La Figura 6.21 muestra las microestructuras típicas de superficies pulidas y atacadas químicamente de las muestras obtenidas después de la sinterización a 1250°C/4h.

La microestructura de las muestras de composición C95 sinterizadas a 1250°C está constituida por una fase continua con una gran cantidad de microgrietas, ~10  $\mu$ m de longitud, la cual fue identificada como  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> en acuerdo con los análisis de DRX (Figura 6.20). Se diferencian regiones de <5  $\mu$ m, uniformemente distribuidas, que por MEB-EDE se ha observado que se trata de silicofosfatos de calcio y teniendo en

cuenta los resultados de DRX se atribuyen a las fases de tipo apatita detectadas por DRX (Fig 6.20). Se observan poros de tamaño pequeño (2-4  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 6.20.** Difractogramas de las muestras de composición C40 y C95 utilizadas en la determinación del módulo elástico y el ensayo de flexión en 3 puntos.



**Figura 6.21** superficies pulidas de las muestras C95 y C40 sinterizadas a 1250°C/4h.

La microestructura de la muestra C40 muestra una microestructura de grano fino constituida por dos fases cristalinas, fosfato tricálcico y dióxido como se determinó por microanálisis por MEB-EDE. El tamaño de poro es pequeño (2 - 4  $\mu\text{m}$ ). Se pueden observar grietas en los bordes de grano del fosfato tricálcico de 3-4  $\mu\text{m}$  de longitud.

Al igual que en las muestras analizadas en el apartado de caracterización microestructural, los resultados del microanálisis por MEB-EDE de los granos de fosfato tricálcico confirman la presencia de Mg y Si en solución sólida.

Las microgrietas en los dos materiales han podido generarse por la anisotropía de las fases presentes  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P,  $\beta$ -C<sub>3</sub>P y CMS<sub>2</sub> (Tabla 6.3) o por las grandes diferencias en la expansión térmica entre las fases en los materiales bifásicos.

En el compuesto C40, una fase de alta expansión térmica ( $\beta$ -C<sub>3</sub>P,  $\alpha_{500-1200^{\circ}\text{C}} \approx 20-28.8 \times 10^{-6} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ ) está dispersa en una matriz de baja expansión térmica (CMS<sub>2</sub> en C40,  $\alpha_{25-800^{\circ}\text{C}} \approx 10.7 \times 10^{-6} \text{ }^{\circ}\text{C}^{-1}$ ). Debido al alto coeficiente de expansión térmica de las partículas de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, se desarrolla un sistema de esfuerzos perpendiculares a la interfase matriz-partícula, las partículas estarán en tensión durante el enfriamiento. Este sistema de esfuerzos dejará una microgrieta circunferencial alrededor de las partículas de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P durante el enfriamiento. Por lo tanto, los compactos obtenidos presentan grietas y poros a lo largo de los límites de grano de las partículas de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P.

En el compuesto C95, la gran anisotropía cristalográfica de la fase  $\beta$ -C<sub>3</sub>P (Tabla 6.3), es la causante de la gran cantidad de grietas observadas. Sin embargo, esta misma característica es la causante del elevado módulo de Weibull (Figura 6.23). La elevada presencia de grietas, hace que la falla ocurra por la coalescencia de estos defectos y no por la propagación de un defecto en singular.

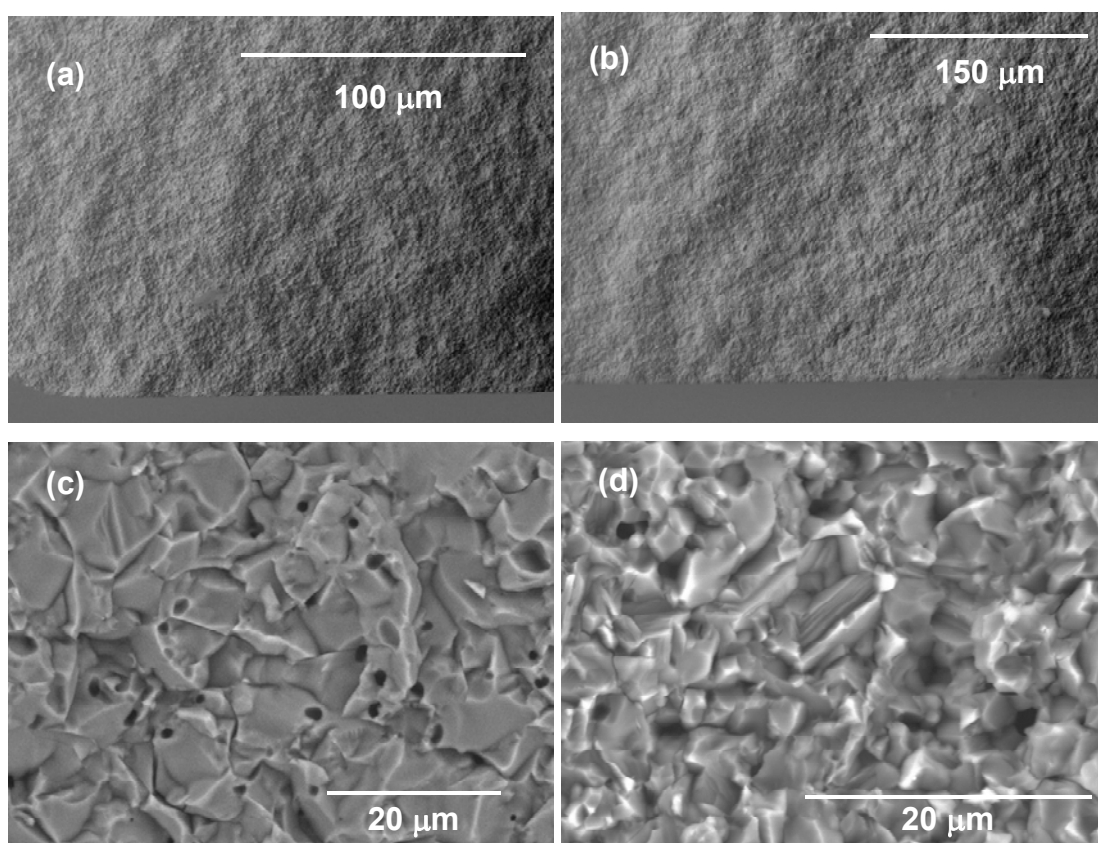
Estos defectos explican las bajas propiedades mecánicas de los materiales compuestos. Se sabe que hay varios factores que afectan las propiedades mecánicas de la cerámica y el tamaño del defecto es uno de los factores más importantes. Las grietas grandes ( $>10 \text{ }\mu\text{m}$ ), detectadas en los bordes de grano de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P en las superficies pulidas de las muestras (Figura 6.21), actuarían como defectos críticos y explicarían los bajos valores de la resistencia característica obtenida para este material (Tabla 6.5).

En la Figura 6.22 se presentan las fotomicrografías típicas de las superficies de fractura de las muestras C40 y C95 sinterizadas a 1250°C /4h. En la muestra de la composición C40 se detalla la zona plana característica de la fractura frágil en la zona de máxima tensión, Figura 6.22(b), la fractura es tortuosa y de carácter mixto (predomina la fractura intergranular).

En la muestra C95 a altas magnificaciones, Figura 6.22 (c), se observa que la fractura es tortuosa y mixta (predomina la fractura intergranular), además se observa la presencia de grietas alrededor de los granos que son perpendiculares a la superficie

de fractura. Esto unido al hecho que no se observa la zona plana característica de la fractura frágil, Figura 6.22(a), revela que la fractura se produjo por la coalescencia de grietas y no por la propagación de un defecto en singular

En la Tabla 6.5 se listan los valores de densidad, resistencia a la flexión y el módulo elástico, determinados para los compactos C40 y C95 sinterizados a 1250°C/4h. Se presentan a manera de comparación los valores determinados por otros autores para cerámicas de fosfato tricálcico y dióxido y del hueso.



**Figura 6.22.** MEB de las superficies de fractura de los materiales sinterizados a 1250°C. (a) C95 y (b) C40 en la zona de máxima tensión; (c) C95 y (d) C40 a mayores aumentos para observar el tipo de fractura.

Teniendo en cuenta el valor del módulo de elasticidad de un material totalmente denso de  $C_3P$  y del  $CMS_2$ , Tabla 6.5, así como el tanto por ciento en volumen de estas fases en el material C40 (42,75 % vol de  $C_3P$  y 57,25 % vol. de  $CMS_2$ ) y la porosidad de la muestra ( $\approx 5\%$ ) se ha estimado que el módulo de elasticidad del material compuesto

C40 usando un modelo numérico<sup>(a)</sup> <sup>(14)</sup> debería ser de 126 GPa. El valor determinado de 77 GPa es debido a la presencia de defectos adicionales tales como grietas que disminuyan el módulo de Young del material.

**Tabla 6.5.** Propiedades mecánicas de los materiales estudiados. Se muestran valores de los materiales puros y del hueso obtenidos en la bibliografía.

	C40	C95	$\beta$ -C <sub>3</sub> P <sup>(12)</sup>	CMS <sub>2</sub> <sup>(15)</sup>	Hueso <sup>(16)</sup>
Resistencia a la flexión (MPa)	34±2	42±2	80-89	300	50-150
Módulo de Young (GPa)	77±3	71±4	115	170	7-25
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	3,1±0,1	2,9±0,2			
Porosidad (%)	5	5	0	0	n.d.

De la misma manera para la muestra C95 formada por una sola fase cristalina,  $\beta$ -C<sub>3</sub>Pss, se puede estimar su módulo elasticidad teniendo en cuenta el valor para un material totalmente denso de 115 GPa, Tabla 6.5, y su porosidad, el valor así obtenido es de 99 GPa, de nuevo las diferencias observadas se deben la presencia de grietas y/o otros defectos.

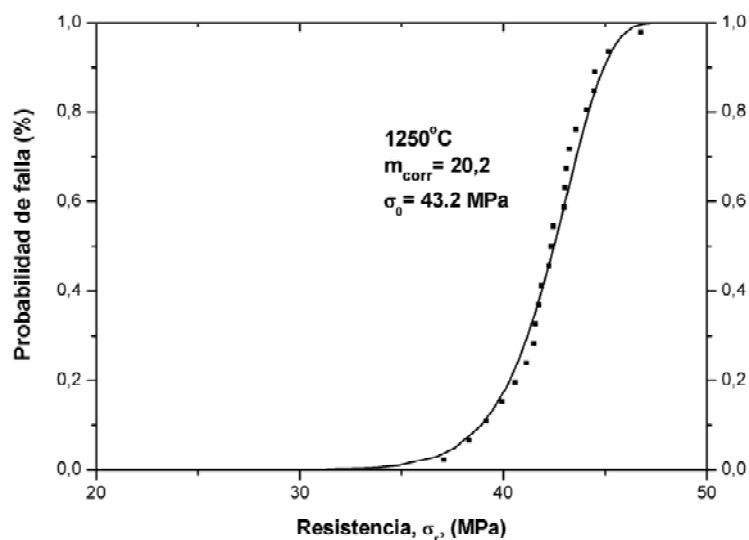
Por otro lado, la resistencia a la flexión y el módulo de Young de las dos cerámicas C40 y C95 son similares a las del hueso cortical (resistencia a la flexión: 50-150 MPa, módulo de Young: 70-30 GPa)<sup>(16)</sup>.

Con los datos de la muestra C95 se realizó un estudio de Weibull con el fin de realizar una comparación con los resultados obtenidos en el experimento de compresión diametral. Los resultados se muestran en la Figura 6.23. A pesar que la fractura no se produjo por defectos críticos, se encuentra un buen acuerdo entre los datos experimentales y la distribución monomodal calculada con un 90% de límite de confianza, al igual que lo encontrado en la prueba de compresión diametral. Como se puede observar se tiene un módulo de Weibull mayor al obtenido con las diferentes muestras realizadas por compresión diametral. Este tipo de acuerdos se ha encontrado también para materiales con alta porosidad cuya fractura tampoco está originada por un defecto en particular<sup>(17)</sup>. Este comportamiento puede explicarse teniendo en cuenta que en la prueba de compresión diametral hay mayor probabilidad defectos de tamaños diferentes debido a que la región expuesta a tensión es un área

<sup>a</sup> El módulo de elasticidad se ha estimado utilizando la formula empírica  $E = E_0 \cdot e^{-bP}$ . Se ha usado un valor de  $b=3$  correspondiente para un material de alúmina de poros redondos.



(el área diametral transversal a la fuerza aplicada), mientras que en los experimentos de flexión solo es una línea (la línea inferior).



**Figura 6.23** Distribuciones de probabilidad de falla acumulativa frente a la resistencia a la flexión en tres puntos de las muestras C95 sinterizadas a 1250°C/4h. Los símbolos corresponden a los datos experimentales y las líneas continuas a la distribución de Weibull calculada utilizando los valores de  $m$  y  $\sigma_0$  mostrados en la Figura.

## 6.4 Discusión

### *Sinterización-Reacción*

Teniendo en cuenta los resultados del análisis térmico a velocidad de calentamiento constante (ATD y Dilatometría), los resultados de los estudios realizados por DRX y MEB-EDE sobre muestras tratadas a diferentes temperaturas durante cuatro horas, y el diagrama de equilibrio de fases del sistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaMg}(\text{SiO}_3)_2\text{-SiO}_2$ , el proceso de sinterización de compactos homogéneos de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-SiO}_2\text{-CaCO}_3\text{-MgO}$  tiene lugar: a) a temperaturas inferiores a 1300 °C fundamentalmente en estado sólido; y b) a temperaturas superiores tiene lugar en presencia de fase líquida que en función de la temperatura y la composición puede ser transitoria.

Así se ha comprobado que:

1. El proceso de sinterización reacción empieza a  $T > 800^\circ\text{C}$ , a esta temperatura se descompone el  $\text{CaCO}_3$  dando lugar a la formación de  $\text{CaO}$  libre que facilita las reacciones en estado sólido con el resto de los óxidos.

2. Entre 800 y 1277 °C los procesos de reacción entre el componente mayoritario  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y los minoritarios  $\text{CaO}$ ,  $\text{SiO}_2$  y  $\text{MgO}$  tienen lugar simultáneamente con los de sinterización. En este intervalo de temperaturas los granos de sílice más gruesos, utilizados en la formulación de las composiciones, reaccionan con la  $\text{SiO}_2$  formando segregaciones homogéneamente dispersas (posiblemente Si-apatita).
3. Estas segregaciones, observadas en ambas muestras, deben originar líquidos transitorios a  $T \geq 1277^\circ\text{C}$ , temperatura eutéctica del sistema  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ - $\text{SiO}_2$ , que hacen que se retrase el proceso de sinterización.
4. Teniendo en cuenta que la transformación polimórfica de  $\beta \rightarrow \alpha$   $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y la formación de fases líquidas son expansivas y se contraponen a la sinterización, y las curvas de sinterización establecidas el margen de sinterización para C95 está entre 1250 y 1400 °C y para C90 entre 1250 y 1350 °C.
5. Las muestras de la composición C95 sinterizadas a 1300 °C están constituidas mayoritariamente por  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss, al nivel de resolución del MEB no se observa la presencia de fases líquidas en borde de grano.
6. Las muestras de la composición C95 sinterizadas a 1400°C y 1450°C están formadas por  $\alpha$ - +  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss. En las muestras sinterizadas a 1450°C se detectan fases líquidas.
7. Estos resultados coinciden con estudios previos<sup>(16)</sup> en los cuales se determinó que para  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  comercial la máxima densificación se logra a 1300°C.
8. Las muestras de la composición C90 están formadas por  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ss a todas las temperaturas. En las muestras sinterizadas a 1400 y 1450°C se observan cantidades significativas de fase líquida.
9. Por otro lado, durante el enfriamiento en las composiciones en las que se han formado fases líquidas, aquellas que están en el campo primario de cristalización del  $\alpha$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y se han sinterizado a temperaturas superiores a 1450°C, región  $\alpha$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  + líquido del diagrama de equilibrio, si se enfrían a una velocidad suficientemente lenta pueden formarse dos tipos de microestructuras:
  - a) En las **composiciones hiperperitéticas**, con exceso de  $\alpha$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , se obtiene una morfología particular formada por granos con forma de plaquetas con una elevada relación de aspecto de  $\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (4:80  $\mu\text{m}$ ) y fuertemente orientados embebidos en grandes granos de  $\alpha$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ( $\approx 100$   $\mu\text{m}$ ) que actúan como matriz. Las fases  $\alpha$  y  $\beta$  presentan solución sólida de Mg y Si.

- b) En las **composiciones hipoperitéticas**, con un exceso de líquido, todo el  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sufre la reacción peritética y no se forma ninguna morfología particular.

### **Estudio mecánico**

Las propiedades mecánicas, resistencia a la compresión diametral, flexión en tres puntos y modulo de elasticidad, determinadas para los distintos materiales sinterizados se explican en función de los cambios en la microestructura descritos previamente.

El modo de fractura de las muestras monofásicas es transgranular lo que generalmente conduce a menores resistencias a la fractura. Las muestras bifásicas con una microestructura más homogénea y fractura intergranular tienen un menor tamaño de defecto crítico aparente y una mayor resistencia. La considerable disminución del módulo de Weibull de estos ejemplares, debe estar relacionada con la presencia de microgrietas, como se observa en las superficies pulidas.

En los materiales monofásicos las microgrietas se han generado durante el enfriamiento por la anisotropía en los coeficientes de expansión térmica del  $\beta$ -y  $\alpha$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . En los materiales con microestructura bifásica  $\alpha$  y  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y  $\beta$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$   $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  también se deben tener en cuenta las tensiones generadas durante el enfriamiento consecuencia de las diferencias entre los coeficientes de dilatación de los polimorfos del fosfato tricálcico y entre el  $\beta$  fosfato tricalcico y el dióxido (Tabla 6.3).

Finalmente la resistencia a la flexión (42-34 MPa) y el módulo de Young (71-77 GPa) de las dos cerámicas C95 y C40 son similares a las del hueso cortical (resistencia a la flexión: 50-150 MPa, módulo de Young: 70-30 GPa)(15). Los valores de resistencia a la compresión diametral de los materiales de  $\alpha+\beta$  fosfato tricálcico (32-37 MPa) son significativamente mayores que los de las cerámicas comerciales de  $\beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (1-5 Mpa)<sup>(18)</sup> y que materiales sin adición de Mg y Si procesados mediante los mismos métodos de procesamiento (16 – 18 MPa), Tabla 6.4 y Figura 6.16.

## **6.5 Conclusiones**

Se ha establecido el procesamiento para obtener materiales de  $\alpha+\beta$ ,  $\beta$ - $\text{C}_3\text{P}$  dopado con Mg y Si o  $\beta$ - $\text{C}_3\text{Pss-CMS}_2$  con densidades y propiedades mecánicas óptimas (composición, temperatura de sinterización y velocidades de calentamiento y enfriamiento).

Se ha comprobado que la adición de Mg y Si al  $C_3P$  da lugar a procesos de sinterización reactiva en presencia de líquidos transitorios a temperaturas 1200-1300°C que mejoran la densificación de los compactos.

Las diferencias entre las propiedades mecánicas de los distintos materiales monofásicos y bifásicos sintetizados se atribuyen a diferencias microestructurales (tamaño de grano y de poro, porosidad, composición mineralógica)

En todos los casos se obtienen materiales con microgrietas inter- y transgranulares, estas microgrietas se pueden formar como consecuencia de los cambios de volumen asociados a la transición de fase  $\alpha \rightarrow \beta$ -  $C_3P$  (7,7 % en volumen) durante los ciclos de calentamiento y enfriamiento muy rápidos.

Así mismo, la fuerte anisotropía de las fases presentes en estos materiales también puede dar lugar a la formación de microgrietas durante el enfriamiento. Así, para la fase  $\alpha$ -  $Ca_3(PO_4)_2$  la diferencia entre los coeficientes de dilatación de los parámetros b y c es de casi dos órdenes de magnitud; en el caso de  $\beta$ - $Ca_3(PO_4)_2$  las diferencias entre el parámetro b y el parámetro a es de 3 veces. Este efecto es más significativo en las muestras con un tamaño de grano más elevado.

El material de  $\beta$ - $C_3P$ , C95 sinterizado a 1300°C/4h, presenta una resistencia a la compresión diametral de 38 MPa significativamente mayor a la de las cerámicas de  $\beta$ - $Ca_3(PO_4)_2$  comerciales (entre 1 -5 MPa). Este material presenta un módulo de Weibull de 10 del orden de los valores esperables en biocerámicas de fosfatos de calcio.

Los materiales de  $\beta$ - $C_3P$  y  $\beta$ - $C_3P$ -CMS<sub>2</sub> obtenidos por sinterización a 1250°C/4h presentan resistencias a la flexión en tres puntos de 42±2 MPa y 34±2 MPa respectivamente, estos valores son del orden de los correspondientes al hueso esponjoso (50 MPa). El valor del módulo de Young determinado para los materiales de  $\beta$ - $C_3P$  y  $\beta$ - $C_3P$ -CMS<sub>2</sub> es de 71±4 y 77±3 GPa respectivamente, estos valores son más próximos a los del hueso que los correspondientes a las cerámicas de diopsido por lo que serán mecánicamente más compatibles.

## Referencias:

- <sup>1</sup> J. A. Pask. Amer. Ceramic. Soc. Annual Meet. (1979)
- <sup>2</sup> P.F. Messer. "Ceramic processing. Asystematic approach". Trans. Brit. Ceram. Soc., 82, 6,190-192, (1983).
- <sup>3</sup> C. Rey, C. Combes, C. Drouet, and S. Somrani. Tricalcium phosphate-based ceramics. Chapter 15 in: Bioceramics and their clinical applications. Edited by Tadashi Kokubo. Chubu University Japan.
- <sup>4</sup> C. X. Wang, X. Zhou, M. Wang, "Influence of sintering temperatures on hardness and Young's modulus of tricalcium phosphate bioceramics by nanoindentation technique", *Materials Characterization*, 52(4/5), 301–307 (2004).
- <sup>5</sup> S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, "Characterisation of hydroxyapatite–tricalcium phosphate bioceramics issued from Ca-deficient hydroxyapatite powders: influence of Ca/P ratio", *Phosphorus Res Bull*, 10 214–219 (1999).
- <sup>6</sup> H. K. Varma, S. Sureshababu, "Oriented growth of surface grains in sintered  $\beta$ -tricalcium phosphate bioceramics", *Mater Lett*, 49, 83–85 (2001).
- <sup>7</sup> R. Famery, N. Richard, P. Boch, "Preparation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics, with and without magnesium addition", *Ceramics Int*, 20 [5] 327–336 (1994).
- <sup>8</sup> X. Yang, Z. Wang, "Synthesis of biphasic ceramics of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate with controlled phase content and porosity", *J Mater Chem*, 8 2233–2237 (1998).
- <sup>9</sup> M. Vallet-Regi, M. Gordo, C. V. Ragel, M. V. Cabanas, J. San Roman, "Synthesis of ceramic–polymer–drug biocomposites at room temperature", *Solid State Ionics*, 101–103 887–892 (1997).
- <sup>10</sup> Cristina de la Calle. Proyecto fin de Carrera de Ingeniería técnica Química de la UAM. Relaciones de fusión en el sistema ternario  $C_3P-CMS_2-S$ . Proyecto fin de Carrera UAM (2006).
- <sup>11</sup> N. Satoshi, O. Ryohei, A. Hideki, A. Masaru, M. Naoki, Y. Takeyuki. "Thermal Expansion of Hydroxyapatite- $\beta$ -Tricalcium Phosphate Ceramics" *Thermochimica Acta*, 165 57-72 (1990).
- <sup>12</sup> M. Milosevski , J. Bossert , D. Milosevski , N. Gruevska. "Preparation and properties of dense and porous calcium phosphate". *Ceramics International* 25 693-696 (1999).
- <sup>13</sup> Larry W. Finger and Yoshikazu Ohashi "The thermal expansion of diopside to 800°C and a refinement of the crystal structure at 700°C". *American Mineralogist*, Volume 61, pages 303-310, 1976

- 
- <sup>14</sup> W.D: Kingery, W.D., H.K. Bowen and D.R. Uhlman. "Elasticity, anelasticity and strength" 768-815 in "Introduction of Ceramics" Ed. A. Wiley-Interscience Publication John Wiley & Sons. (1976)
- <sup>15</sup> T. Nonami, S. Tsutsumi, Study of diopside ceramics for biomaterials, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 10 475-279 (1999).
- <sup>16</sup> L. L. Hench, "Bioceramics: From Concept to Clinic", *J. Am. Ceram. Soc.*, 74, 1487-1510 (1991).
- <sup>17</sup> S. Bueno, B. Ferrari, C. Melandri, G. de Portu, C. Baudín, "Processing of alumina-coated tetragonal zirconia materials and their response to sliding wear" *Ceramics International* 36 1545–1552 (2010)
- <sup>18</sup> N. Bouslama, F. Ben Ayed, J. Bouaziz. Sintering and mechanical properties of tricalcium phosphate–fluorapatite composites *Ceramics International* 35 1909–1917 (2009)

**Capítulo 7.**

**ESTUDIOS IN VITRO EN SOLUCIONES ACELULARES:  
ENSAYOS DE BIODEGRADABILIDAD EN TRIS-HCl  
ENSAYOS DE BIOACTIVIDAD EN SUERO  
FISIOLÓGICO ARTIFICIAL.**





Es un hecho conocido que la biodegradación o reabsorción de un material *in vivo* tiene lugar a través de un proceso complejo, en el que interactúan mecanismos físico-químicos con mecanismos de tipo biológico a través de procesos en los que intervienen proteínas y células. Por lo tanto, la biodegradación de un material no depende exclusivamente de sus propiedades físico-químicas. Sin embargo, la velocidad de disolución de los materiales afecta significativamente al comportamiento del material *in vivo*. Así, si un material es demasiado soluble, se degradará de forma pasiva en los fluidos fisiológicos sin estimular la remodelación del tejido. Por otro lado, si el material tiene un grado de solubilidad adecuado, se llevará a cabo la reabsorción activa del mismo, es decir, un proceso de reabsorción donde las células interactúan con el material y lideran el proceso de regeneración ósea de una forma más parecida al mecanismo natural o biológico de formación del hueso.

En este contexto, el conocimiento del mecanismo de disolución, el comportamiento físico-químico de un material durante el proceso de reabsorción presenta aspectos claves, que deben ser caracterizados con detalle.

Para evaluar la solubilidad *in vitro* de los fosfatos de calcio se realizan estudios de inmersión en agua y en soluciones tampón como el suero fisiológico artificial (SFA) y el Tris-HCl pH=7,4. En SFA, los procesos de disolución están a menudo acompañados de precipitaciones debido a la alta concentración de iones calcio y fosfato en la solución

La evaluación del comportamiento durante la disolución de los fosfatos permitirá controlar la velocidad de liberación de iones, Ca, Mg, P, y Si, lo cual ayudará a estudiar los efectos de la liberación de estos iones sobre la función celular.

El objetivo final de esta tesis es el desarrollo de un material que pueda ser reemplazado gradualmente por el tejido óseo, en ese orden de ideas es de gran importancia el estudio del comportamiento de dicho material durante su interacción con los fluidos biológicos, de manera que se pueda evaluar su bioactividad y/o su biodegradación.

La mayoría de los materiales bioactivos desarrollados hasta la fecha forman una capa de apatita/carbonatoapatita sobre su superficie y a través de ella se unen al hueso. Esta formación de apatita *in vivo* puede ser reproducida *in vitro* sobre las superficies de los materiales en un fluido acelular (suero fisiológico artificial, SFA) con

concentraciones de iones casi iguales a las del plasma de la sangre humana. Por tanto, es conveniente examinar la formación de apatita/carbonatoapatita en la interfaz material/ SFA con el fin de predecir la capacidad de un material para unirse al hueso, y así reducir el número de experimentos necesarios con animales.

El SFA se ha utilizado por muchos investigadores para la evaluación *in vitro* de la bioactividad de los materiales y se ha estandarizado como una solución para la evaluación *in vitro* de la capacidad de formación de apatita/carbonatoapatita de los materiales de implante por la Organización Internacional de Normalización (ISO). Sin embargo, se ha demostrado que el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P es de los pocos materiales que se unen al hueso sin formar una capa de apatita/carbonatoapatita<sup>(1)</sup>, lo que indicaría que la no formación de capa en estos experimentos no es concluyente con respecto a la capacidad de unión ósea. Es por tanto, de gran importancia para este tipo de materiales, evaluar también su biodegradabilidad, bioreabsorbilidad y/o solubilidad.

En este capítulo se describe la interacción de los materiales de C<sub>3</sub>P desarrollados con una solución tampón de Tris-HCl y con el SFA. Con los resultados obtenidos se evaluará la biodegradabilidad, la solubilidad y la capacidad de formación de apatita sobre la superficie de estos materiales.

## 7.1 Revisión Bibliográfica

La reabsorción “in vivo” de un material de C<sub>3</sub>P está controlada por dos factores: la solubilidad (autodisolución) y la disolución generada por células.

Hay muchos factores que afectan a la solubilidad de las cerámicas de fosfatos de calcio incluyendo el método de preparación, contenido y tipo de fase, la densidad, el grado de sustitución iónica en la red del C<sub>3</sub>P y la microestructura. La introducción de iones, como Si, Mg, Zn, interrumpe la red del C<sub>3</sub>P y modifica su solubilidad. Un alto nivel de meso-porosidad también se puede utilizar para proporcionar una mayor superficie de intercambio de iones.

### 7.1.1 Estudio de los procesos de disolución de los materiales bioactivos

Los materiales artificiales implantados en defectos óseos suelen ser encapsulados por tejido fibroso, el cual los aísla del hueso que lo rodea, y por consiguiente no se vinculan con el hueso vivo. Esta es la reacción normal de protección del cuerpo vivo

contra elementos extraños. A causa de esta reacción, la mayoría de los materiales artificiales no se pueden utilizar como sustitutivos óseos.

Hench y col.<sup>(2)</sup> (1972) demostraron por primera vez que algunos vidrios del sistema  $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$ , denominados biovidrios®, se adhieren espontáneamente al hueso vivo, sin formación de tejido fibroso en su superficie. Desde entonces, se ha encontrado que diversos tipos de materiales cerámicos sintéticos, tales como la hidroxiapatita sinterizada, el  $\beta$ -fosfato tricálcico sinterizado, las cerámicas bifásicas de hidroxiapatita - fosfato tricálcico y vitrocerámicas de apatita-wollastonita (A-W), se unen al hueso vivo. A estos materiales se les ha denominado materiales bioactivos y se utilizan clínicamente como importantes sustitutos óseos. Sin embargo, estos materiales bioactivos no pueden sustituir a todos los autoinjertos. Se pretende por tanto, desarrollar nuevos materiales bioactivos con mayor capacidad de unión al hueso y diferentes propiedades mecánicas.

Mediante sus estudios Hench et al,<sup>(2)</sup> demostraron que los biovidrios® forman una capa de fosfatos de calcio sobre su superficie y a través de esa capa se unen al hueso vivo. Ellos encontraron que la capa de fosfato de calcio en los vidrios se puede formar *in vitro* en soluciones tamponadas a pH 7,4 por Tris(hidroximetil)aminometano y ácido clorhídrico (Solución tampón Tris-HCl).

Posteriormente, Kitsugi y col.<sup>(3)</sup> (1987) encontraron que vitrocerámicas, con apatita y wollastonita cristalina, también forman una capa de fosfato de calcio. Mediante difracción de rayos X identificaron que esta capa era una apatita cristalina<sup>(4)</sup>. Kokubo y col<sup>(5,6)</sup>, demostraron que la formación de apatita *in vivo* puede ser reproducida en un SFA libre de sustancias orgánicas, acelular, y con concentraciones de iones cercanas a las del plasma humano. Sin embargo, este SFA inicial propuesto por Kokubo y col. carecía de iones sulfato, los cuales están presentes en el plasma sanguíneo humano. Posteriormente, el mismo Kokubo<sup>(7)</sup> ha sugerido correcciones en las concentraciones de iones del SFA.

Se debe señalar que el SFA corregido es más rico en iones cloruro y más pobre en iones bicarbonato que el plasma sanguíneo humano. Oyane y col.<sup>(8,9)</sup> propuso una versión revisada del SFA, en el que las concentraciones de los iones cloruro y bicarbonato, están al nivel del plasma sanguíneo humano. Sin embargo, el carbonato de calcio tiende a precipitar durante el ensayo o la preservación de este SFA revisado, puesto que está sobresaturado no sólo con respecto a la hidroxiapatita, sino también

con el carbonato de calcio. Más tarde, Takadama y col.<sup>(10)</sup> propusieron un nuevo y mejorado SFA, en el que sólo se establece la concentración de iones de cloruro en el nivel de plasma sanguíneo humano, las concentraciones de iones bicarbonato no fueron modificadas respecto al del SFA corregido. Este SFA mejorado se comparó con el SFA corregido tanto en su estabilidad, como en la reproducibilidad de la formación de apatita/carbonatoapatita en materiales sintéticos por 10 institutos de investigación. No se encontraron diferencias entre los resultados obtenidos por los distintos grupos de investigación. Como resultado, el 'SFA' corregido se presentó como la solución para la evaluación *in vitro* de la capacidad de formación de apatita de los implantes a la Organización Internacional de Normalización, el cual fue aprobado como norma ISO 23317 en junio de 2007. Un protocolo para la preparación de SFA y los métodos para examinar la formación de apatita/carbonatoapatita fueron publicados por Kokubo y Takadama<sup>(11)</sup>.

Kokubo y Takadama<sup>(12)</sup> hicieron una revisión bibliográfica en la que demuestran que hay una buena correlación entre la capacidad de enlace óseo *in-vivo* y la capacidad de formación de una capa de apatita/carbonatoapatita *in vitro* en la interfaz con el SBF. Ellos encontraron que gran cantidad de materiales (vitrocerámicos, cerámicas cristalinas, compuestos inorgánicos-orgánicos y metales) que han demostrado formar un enlace con hueso vivo en experimentos animales, también han mostrado capacidad de formación de apatita/carbonatoapatita de un material en SFA. Está demostrado que el  $\beta$ -fosfato tricálcico y la calcita, son los únicos materiales que se enlazan al hueso vivo sin que aparezca en la interfaz una capa de apatita/carbonatoapatita sobre sus superficies en SFA. Además, se ha publicado que la velocidad de formación de hueso alrededor de las partículas de vidrio disminuye con el aumento del contenido de  $\text{SiO}_2$  de los vidrios<sup>(13)</sup>, así también, se publicó que los tiempos requeridos para que los vidrios sean totalmente recubiertos con apatita/carbonatoapatita en SFA decrece al aumentar del contenido de  $\text{SiO}_2$ <sup>(14)</sup>. Teniendo en cuenta las anteriores afirmaciones, Kokubo y Takadama concluyeron que la capacidad de formación de apatita/carbonatoapatita de un material en SBF puede ser un indicio de la capacidad de unión ósea del material.

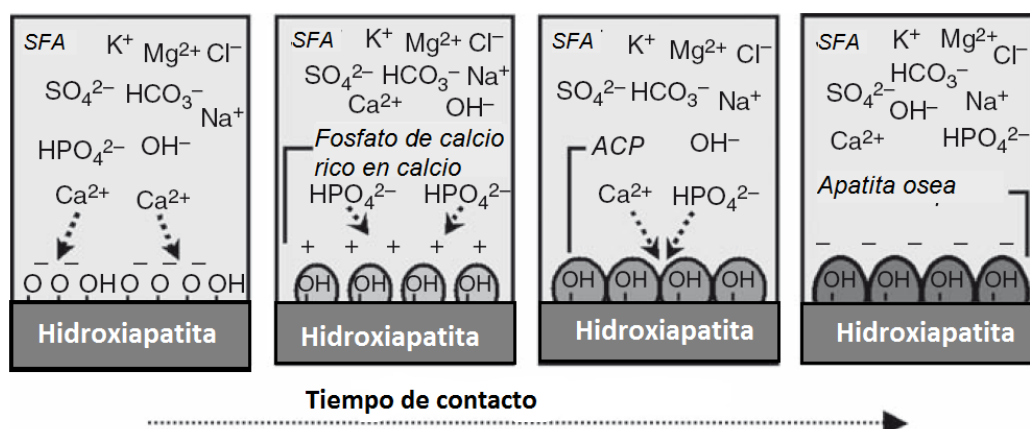
El fluido corporal humano está sobresaturado con respecto a la apatita, incluso en condiciones normales<sup>(7)</sup>. A pesar de ello, la apatita solo precipita en el tejido óseo y no lo hace en el resto del cuerpo, esto se atribuye a que la barrera de energía para la nucleación de apatita es muy alta. Esto significa que una vez que los núcleos de apatita se forman en un material en el cuerpo vivo, pueden crecer de forma

espontánea con consumo de iones calcio y fosfato del fluido corporal cercano. Se ha encontrado que grupos funcionales, tales como Si-OH, Ti-OH, Zr-OH, Nb-OH, Ta-OH, COOH y PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> son eficaces para la nucleación de apatita. Los efectos catalíticos de estos grupos funcionales se han atribuido a sus cargas negativas. Estos hallazgos fundamentales son útiles para el diseño de nuevos tipos de material de unión-ósea.

### 7.1.2 Mecanismo de formación de apatita en los materiales bioactivos

El mecanismo de formación de apatita sobre hidroxiapatita sinterizada en SFA, se ha identificado por microscopia electrónica de transmisión (MET) y medidas de potencial zeta, y se muestra de forma esquemática en la Figura 7.1<sup>(14)</sup>.

1. La superficie de la hidroxiapatita sinterizada se carga negativamente y se combina con iones Ca<sup>2+</sup> del fluido cercano cargados positivamente, como se muestra en la Figura 7.1.
2. Sobre la hidroxiapatita sinterizada se forma un fosfato de calcio amorfo rico en Ca. A medida que los iones Ca<sup>2+</sup> se acumulan, la superficie de la hidroxiapatita sinterizada empieza a cargarse positivamente y reacciona con los iones fosfatos cargados negativamente.
3. Se forma un fosfato de calcio amorfo deficiente en Ca.
4. Este fosfato de calcio amorfo se transforma en apatita cristalina similar al hueso.



**Figura 7.1** Esquema de representación del mecanismo de formación de apatita sobre hidroxiapatita sinterizada en SFA propuesto por Kim y col, 2004<sup>(14)</sup>.

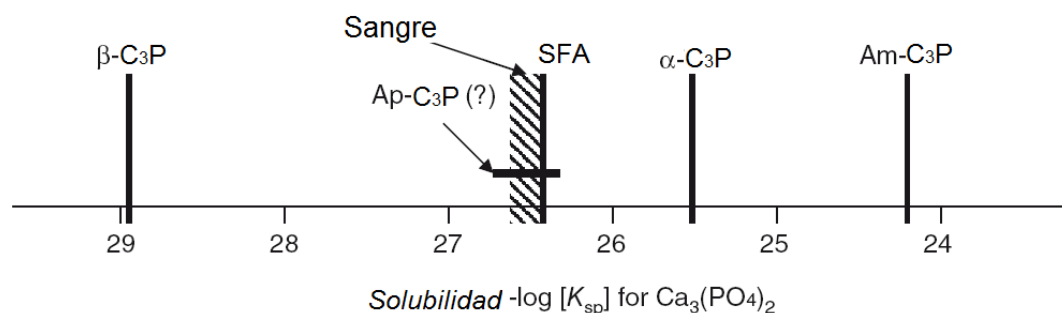
Este mecanismo es esencialmente el mismo que propuso Kokubo y col.<sup>(15)</sup> en SFA con contenido de proteínas.

La formación de apatita sobre vidrios de  $\text{Na}_2\text{O-SiO}_2$  con grupos Si-OH se ha descrito por Takadama y col.<sup>(16,17)</sup>.

### 7.1.3 Propiedades Biológicas del $\text{C}_3\text{P}$

Los experimentos en SFA se han convertido en un requisito previo para la predicción del comportamiento *in vivo* de los biomateriales ortopédicos. En el caso del  $\text{C}_3\text{P}$ , sin embargo, los experimentos en SFA podrían dar lugar a resultados muy diferentes dependiendo del polimorfo de  $\text{C}_3\text{P}$  y las condiciones de ensayo. Como se puede deducir de la Figura 7.2 el SFA a  $37^\circ\text{C}$  está sobresaturado con respecto a  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ , y probablemente respecto al  $\text{ap-C}_3\text{P}$ , sin embargo, está insaturado con respecto a  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$  y el  $\text{am-C}_3\text{P}$ . En cuanto al  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  y al  $\text{ap-C}_3\text{P}$ , se ha demostrado que favorecen la formación de una capa de carbonato-apatita cristalina en SFA. Aunque se ha encontrado que esta capacidad generalmente es más bien baja en el caso del  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ <sup>(18,19)</sup>, y parece más evidente en el  $\text{ap-C}_3\text{P}$  que en la hidroxiapatita estequiométrica.<sup>(20)</sup> Estas observaciones pueden estar relacionadas con la capacidad de nucleación de estos dos  $\text{C}_3\text{P}$ 's: el  $\text{ap-C}_3\text{P}$  presenta una gran superficie específica y probablemente posee muchos sitios capaces de nuclear apatita en su superficie y por lo tanto puede inducir el crecimiento epitaxial de la carbonato-apatita en el SFA. Este no es el caso del  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ , se ha demostrado que es un pobre nucleador de apatita<sup>(21)</sup>. Por otra parte, la sobresaturación de SFA en relación con el  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  y el  $\text{ap-C}_3\text{P}$  es mucho menor que la relativa a la hidroxiapatita estequiométrica. Por lo tanto, la cantidad de depósitos de Ca-P que se pueden formar en los  $\text{C}_3\text{P}$  en sistemas cerrados será inferior a los formados sobre hidroxiapatita estequiométrica.

Por el contrario, el  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$  y el  $\text{am-C}_3\text{P}$  deberían disolverse en SFA, y como fases inestables, podrían experimentar una reacción de hidrólisis, transformándose en apatita, o incluso en fases metaestables más solubles que la apatita (tales como el octofosfato de calcio  $\text{OCP}$ <sup>(19)</sup>) pero con una velocidad de crecimiento de cristal más rápida. En estos  $\text{C}_3\text{P}$ 's, la formación de carbonato-apatita (o incluso  $\text{OCP}$  en algunos casos) en SFA no parece estar relacionada con la capacidad de nucleación, sino que es consecuencia de la conversión en solución acuosa de estas fases inestables en la fase más estable apatita/carbonatoapatita (en algunos casos se forma  $\text{OCP}$ ). En presencia de estos  $\text{C}_3\text{P}$ 's inestables y una superficie de nucleación, tal como la hidroxiapatita, aumenta la formación de apatita a medida que se forman más núcleos de crecimiento cristalino desde la disolución de los  $\text{C}_3\text{P}$ 's más solubles.<sup>(22)</sup> Estas mezclas se pueden utilizar en el diseño de cementos Ca-P.<sup>(23)</sup>



**Figura 7.2** Comparación de los productos de solubilidad de las diferentes fases de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y de los productos iónicos correspondientes de los fluidos biológicos a 25°C. El área de dominio de la ap-C<sub>3</sub>P al parecer cubre el de la sangre.

Para estudiar la solubilidad y la biodegradabilidad de los materiales de C<sub>3</sub>P distintos investigadores<sup>(24,25,26)</sup> han propuesto estudios *in vitro* sobre polvo de las muestras en una solución tampón de Tris-HCl.

## 7.2 Materiales de estudio

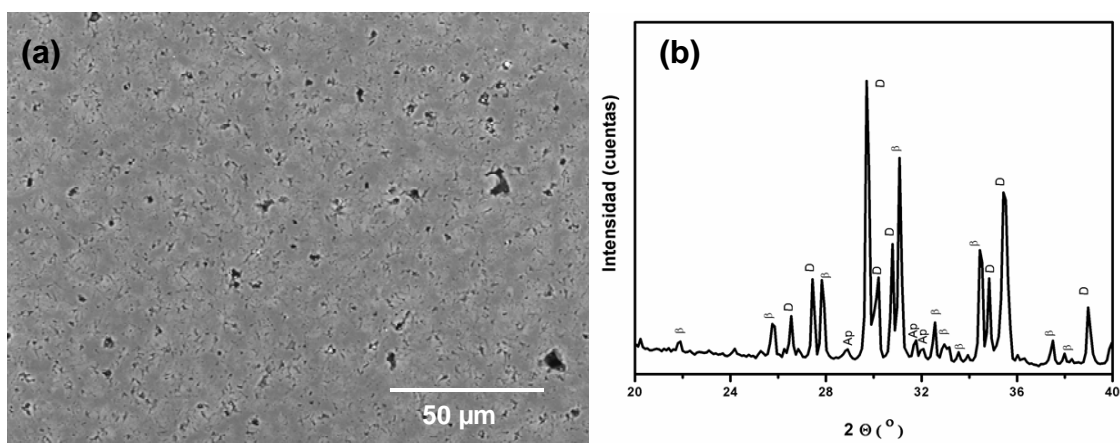
En el presente trabajo se decidió evaluar los estudios *in vitro* de los fosfatos de calcio en dos tipos de soluciones, el suero fisiológico artificial (SFA) y el Tris-HCl pH=7,4. Con el estudio en SFA se pretende evaluar la bioactividad como función de la posibilidad de formación de una capa de apatita sobre la superficie de la muestra en contacto con la solución, y con el estudio en Tris-HCl se pretende evaluar la biodegradabilidad de los materiales y determinar los productos de degradación por disolución en un entorno acuoso. La identificación y cuantificación de los productos de degradación constituyen la base para la evaluación de riesgos y, si procede, de seguridad biológica.

La composición, la temperatura de sinterización y el modo de procesamiento de los materiales cerámicos a los cuales se les realizó los estudios *in vitro* se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados del capítulo 6.

Las muestras se obtuvieron siguiendo procesos similares que en todos los casos constaban de los siguiente pasos: a) homogeneización/activación mecánica por molienda en un molino de atrición con alcohol isopropílico y bolas de PSZ como medio de molienda, b) tamizado (<100μm), c) conformado en forma de barras de 8 mm en moldes de látex d) prensado isostático (200 MPa) y d) sinterización en estado sólido.

Una parte de las barras fue cortada en forma de pastillas de 6mm de diámetro por 2 mm de espesor, y se destinaron al estudio en SFA y otra parte fue molida con destino al estudio de solubilidad en solución de Tris-HCl. Los materiales obtenidos se han caracterizado desde el punto de vista mineralógico, y microestructural (Tabla 7.1).

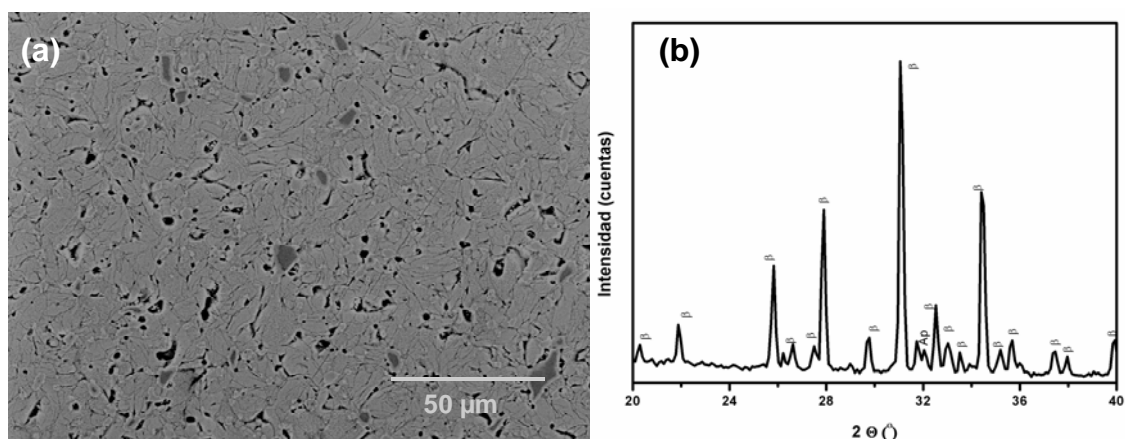
**C40:** Las probetas de esta composición se han obtenido por sinterización convencional a 1250°C /4h de una mezcla de polvos micrométricos de: 40%  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , preparado por reacción en estado sólido de  $2\text{CaHPO}_4 + \text{CaCO}_3$ , con un 60% de dióxido obtenido por reacción en estado sólido de  $\text{MgO}$ ,  $\text{CaCO}_3$  y  $2\text{SiO}_2$ . De los resultados del estudio por DRX y MEB, Figuras 7.3, se deduce que el material presenta una baja porosidad cerrada ( $\approx 5\%$ ) y una microestructura bifásica formada por una distribución homogénea de dióxido ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ) de tamaño micrométrico en una fase continua de fosfato tricálcico. Por difracción de rayos X se ha detectado la presencia de trazas de apatita.



**Figura 7.3.** (a) Micrografía MEB y (b) Difractograma de C40 tratada a 1250°C/4h.

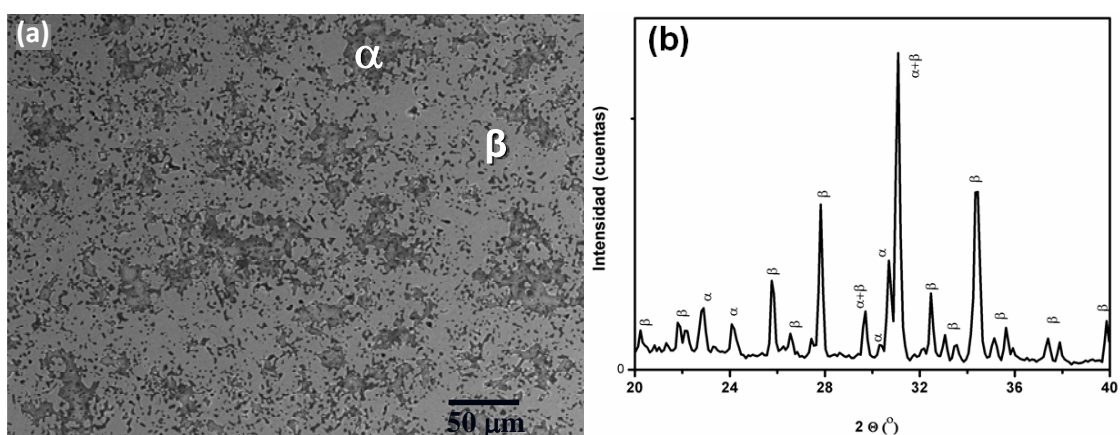
**C95:** Este material se ha obtenido por sinterización reactiva de la mezcla estequiométrica, 95%  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  con las cantidades necesarias de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{SiO}_2$  y  $\text{MgO}$  para formar el 5% de dióxido. La mezcla activada por molienda y prensada en forma de barras se ha calcinado a 1250°C/4h con un palier a 800°C de 1 hora para eliminar el  $\text{CO}_2$ . Este material con una alta densidad (porosidad cerrada  $\approx 5\%$ ) presenta una microestructura compuesta por  $\beta$ -fosfato tricálcico con silicio y magnesio en solución sólida. Se observan pequeñas cantidades de una fase rica en Si, que en acuerdo con los resultados de DRX sería una Si-Ap, distribuida homogéneamente en el material. ver Figura 7.4.





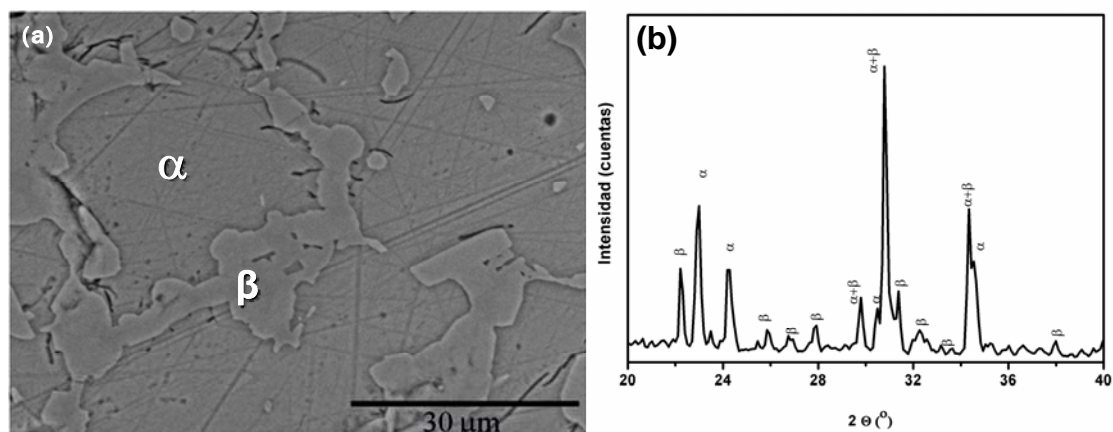
**Figura 7.4.** (a) Micrografía MEB y (b) Difractograma de C95 tratada a 1250°C/4h.

**C99:** Este material se ha obtenido por sinterización convencional a 1300°C /4h del polvo de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  obtenido por reacción en estado sólido (corresponde al  $\text{C}_3\text{P}$ -es del apartado 5.3) de la mezcla estequiométrica de  $2\text{CaHPO}_4 + \text{CaCO}_3$ . Su microestructura con una porosidad elevada,  $\approx 18\%$ , está formada por una fase continua de  $\beta$ -fosfato tricálcico con una pequeña cantidad de magnesio en solución sólida y pequeñas cantidades de  $\alpha$ - $\text{C}_3\text{P}$  dispersas homogéneamente. Ver Figura 7.5. Su denominación de C99 se debe al pequeño contenido de Mg que corresponde con aproximadamente una composición  $99\% \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 : 1\% \text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$



**Figura 7.5.** (a) Micrografía MEB y (b) Difractograma de C99 tratada a 1300°C/4h.

**C100:** Este material se ha preparado por sinterización convencional a 1300°C/4h del polvo de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ultrapuro sintetizado por precipitación química seguida de reacción a 800°C/4h (ver apartado 5.2). Esta cerámica tiene una elevada porosidad  $\approx 10\%$  y su microestructura está formada por granos de  $\alpha$ - $\text{C}_3\text{P}$  con un tamaño de  $\approx 30 \mu\text{m}$  con una pequeña cantidad de granos de  $\beta$ - $\text{C}_3\text{P}$  de  $<10 \mu\text{m}$  situados en puntos triples y bordes de grano. Ver Figura 7.6.



**Figura 7.6.** (a) Micrografía MEB y (b) Difractograma de C100, tratada a 1300°C/4h.

**Tabla 7.1.** Características de los materiales utilizados en los ensayos *in vitro*

Muestra	Densidad <sup>‡</sup> (g/cm <sup>3</sup> )	Porosidad <sup>*</sup> (%)	Fases por DRX y MEB-EDS			
			α-C <sub>3</sub> P	β-C <sub>3</sub> P	CMS <sub>2</sub>	Ap
C40/1250°C	3,08±0,01	5	-	++	++	+tr
C95/1250°C	2,90±0,02	5	-	++	-	+tr
C99/1300°C	2,45±0,03	18	++	+++	-	-
C100/1300°C	2,66±0,03	10	+++	+	-	-

\*El valor de la porosidad se ha estimado teniendo en cuenta los valores de la densidad aparente y de la densidad teórica de cada una de las fases. <sup>‡</sup> La densidad aparente se ha determinado por desplazamiento en agua.

### 7.3 Estudio de solubilidad en Tris-HCl

Se realizaron estudios *in vitro* de muestras en polvo ( $15 \pm 1$  mg) en contacto con una solución ( $15 \pm 1$  mL) de Tris-HCl tampón a pH  $7,4 \pm 0,02$  y  $36,5 \pm 0,5$  °C, como se ha propuesto por distintos investigadores<sup>(27,28,29)</sup>. Se analizó la liberación de iones al medio, la evolución de las fases y los cambios microestructurales del polvo con el tiempo de exposición a la solución. Los detalles experimentales se presentan en el capítulo 3.

#### 7.3.1 Propiedades físico-químicas de los polvos

La superficie específica y el tamaño de partícula son variables de gran incidencia sobre los procesos de disolución-precipitación, especialmente si la cinética del proceso es muy lenta. Por esto se prepararon polvos con superficie específica similares, mediante molienda en molino de carburo de wolframio de los materiales obtenidos

según lo expuesto en el apartado 7.2. En la Tabla 7.2 se presenta el valor de estos parámetros en cada uno de los polvos estudiados.

**Tabla 7.2** Propiedades fisicoquímicas de los polvos sometidos al estudio de biodegradabilidad.

	C100	C99	C95	C40
$d_{10}$ ( $\mu\text{m}$ )	1,6	0,88	0,82	1,05
$d_{50}$ ( $\mu\text{m}$ )	14,0	4,86	4,55	11,6
$d_{90}$ ( $\mu\text{m}$ )	65,3	48,9	60,1	54,3
$S_{\text{esp}}$ ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	1,3	1,3	1,27	1,6

\* Los errores en todos los casos son inferiores al 5%

### 7.3.2 Perfiles de liberación de iones

Los perfiles de liberación de las especies iónicas de Si, Ca, Mg y P en el Tris-HCl para las diversas muestras se presenta en las Figuras 7.7. El cambio de peso de las muestras estuvo por debajo del margen de error experimental (0,3 mg/L).

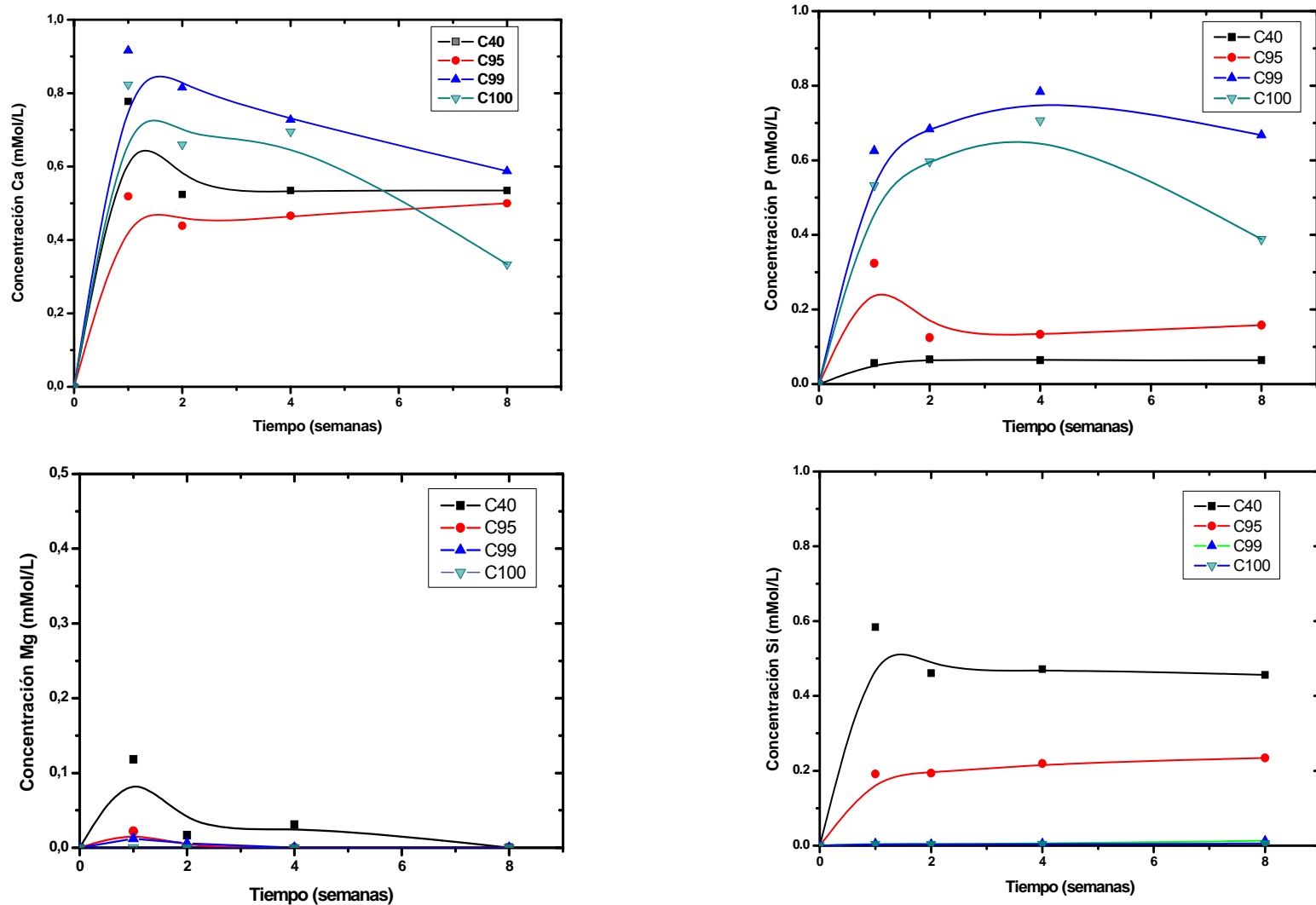
En todos los casos tiene lugar un aumento inicial en el pH desde 7,4 hasta 7,7 y posteriormente se mantiene en este valor durante todo el experimento.

Se observa liberación de iones en todos los materiales durante la primera semana, después se mantienen o disminuyen las concentraciones con el tiempo.

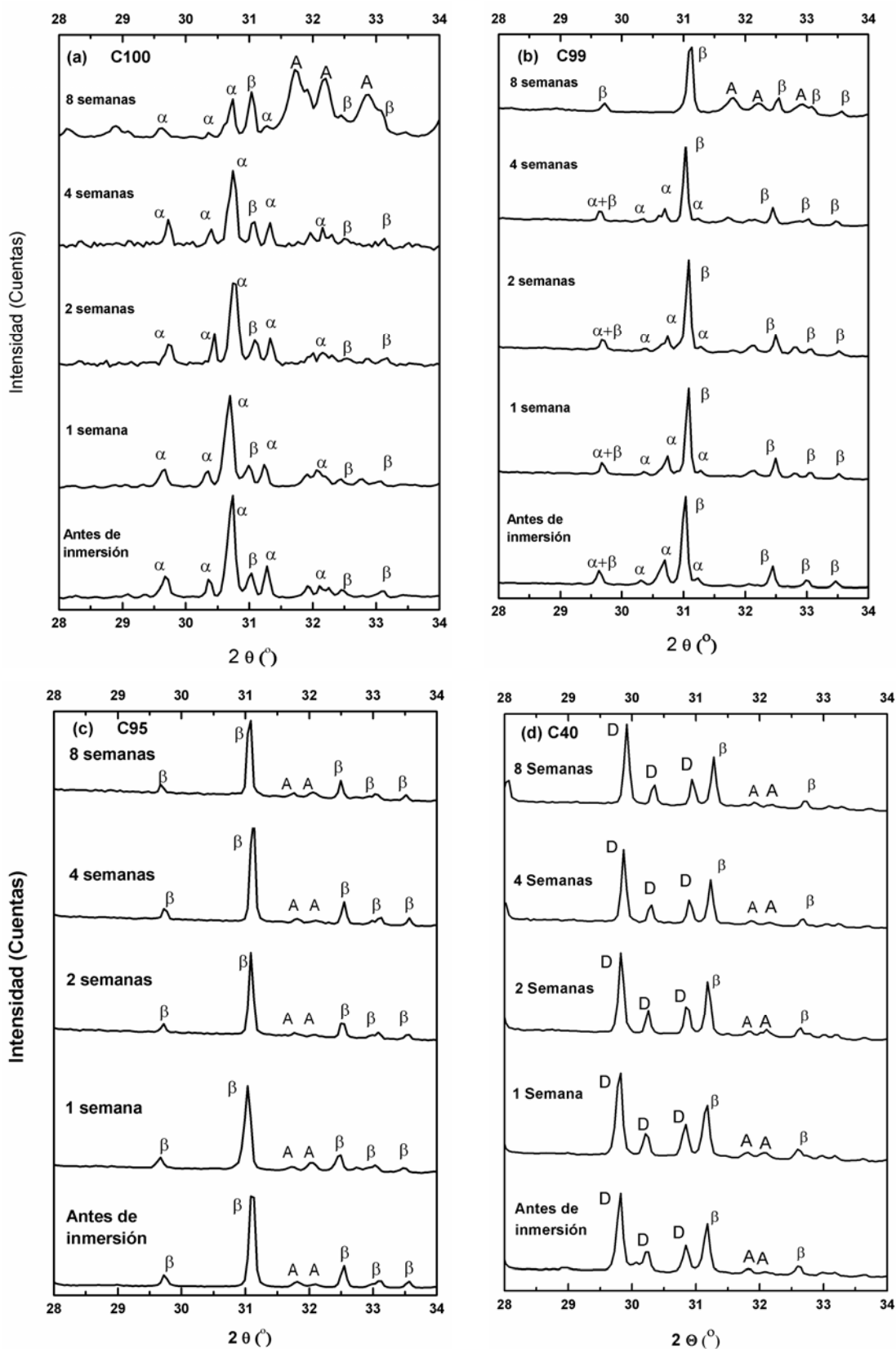
### 7.3.3 Caracterización mineralógica

Se realizó un análisis de las fases presentes en cada una de las muestras (DRX), antes y después de la inmersión en solución de Tris-HCl durante diferentes tiempos. Los resultados se muestran en las Figura 7.8.

En las composiciones C99 y C100 aparecen picos que corresponden con una fase de tipo apatita después de 8 semanas. Las muestras de las composiciones C40 y C95 no sufren transformaciones que se puedan observar desde el análisis de DRX.



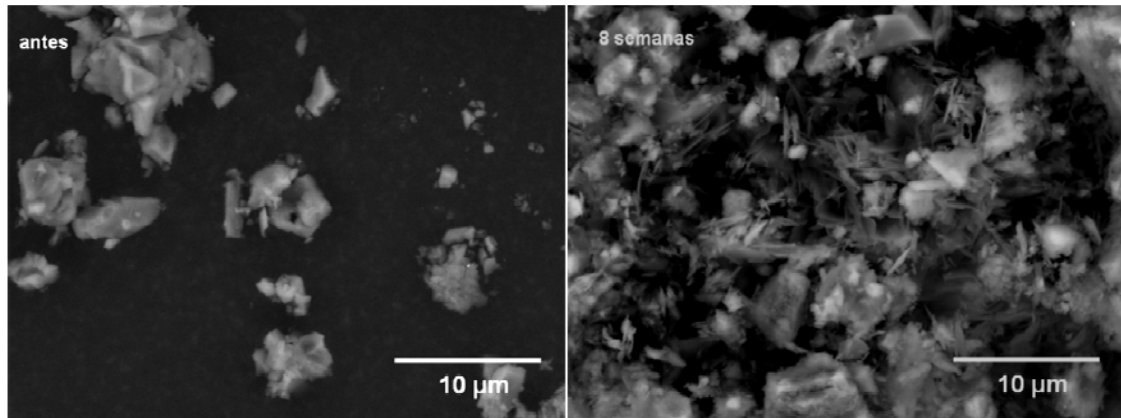
**Figura 7.7.** Cambio en la concentración de iones de calcio, magnesio, fósforo, y silicio con el tiempo de inmersión en la solución de Tris-HCl a  $36,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . En todos los casos los errores experimentales son inferiores al 5%.



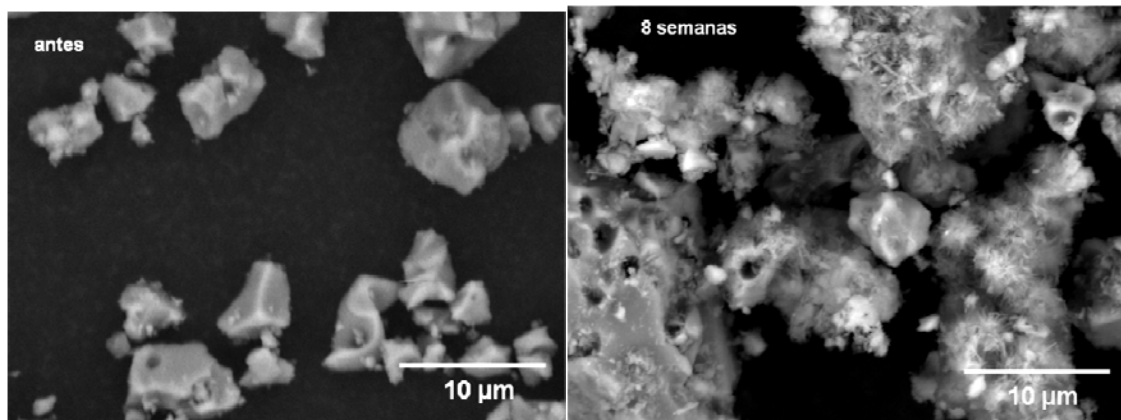
**Figura 7.8.** Evolución de las fases presentes con el tiempo de inmersión de polvo de (a) C100, (b) C99 (c) C95 y (d) C40 en solución de Tris-HCl. . β:  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF 09-0169); α:  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (PDF 09-0348); A :  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}$  (PDF 09-0432). D:  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  (PDF 86-0932).

### 7.3.4 Estudios microestructurales

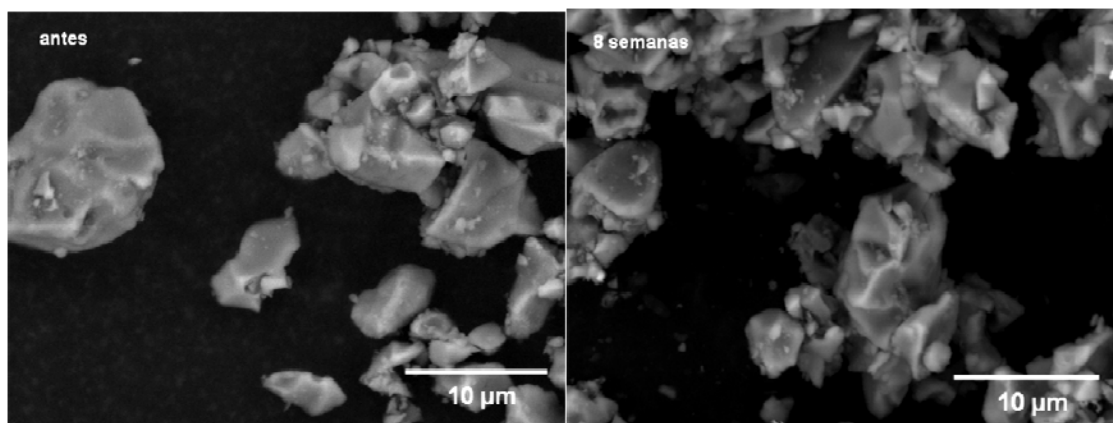
Las Figuras 7.9 a 7.12, muestran respectivamente las imágenes de MEB de los granos de polvo de las cerámicas antes y después de 8 semanas de inmersión en Tris-HCl. No se presentan microfotografía a 1, 2 y 4 semanas debido a que no hay cambios apreciables en el aspecto del polvo respecto al original.



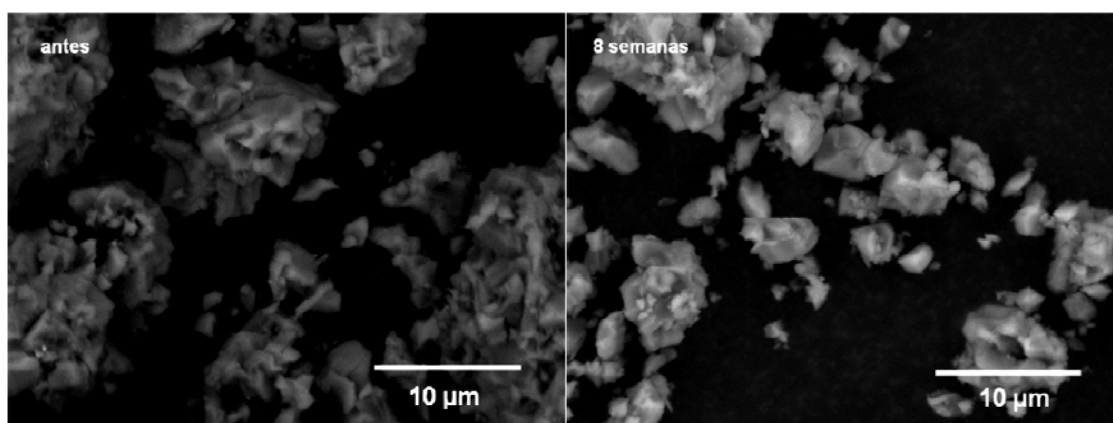
**Figura 7.9.** Imagen MEB del polvo C100 antes y después de 8 semanas de interacción con la solución de Tris-HCl.



**Figura 7.10.** Imagen MEB del polvo C99 antes y después de 8 semanas de interacción con la solución de Tris-HCl.



**Figura 7.11.** Imagen MEB del polvo C95 antes y después de 8 semanas de interacción con la solución de Tris-HCl.



**Figura 7.12.** Imagen MEB del polvo C40 antes y después de 8 semanas de interacción con la solución de Tris-HCl.

### 7.3.5 Discusión de los resultados experimentales del estudio de la biodegradabilidad en Tris-HCl

La interacción de los materiales en polvo con la solución de Tris-HCl se puede resumir de la siguiente manera.

Todos los materiales estudiados presentaron liberación de iones a la solución durante la primera semana de interacción, Figura 7.7. Posteriormente, se observa una disminución de la concentración de los iones en solución, que en el caso de los materiales, C40 y C95 es brusca y se detiene luego de la segunda semana del experimento, mientras que en las muestras C99 y C100, es progresiva y continua

hasta las 8 semanas que duró el experimento, la concentración final solo es significativamente menor en el material C100.

La disminución del contenido iónico en solución, propio de un proceso de precipitación, no se corresponde en todos los casos con un cambio en las fases determinadas por DRX, Figura 7.8. Si durante las 4 primeras semanas de experimentación se produjo algún precipitado, este no pudo ser detectado por DRX. Sin embargo, a las 8 semanas se observa un aumento significativo en la presencia de una fase apatita en las muestras C100 y C99, detectadas por DRX, y visibles en las imágenes MEB de los productos, Figuras 7.9 y 7.10. En estas figuras se observa la presencia de un producto de aspecto acicular que cubre completamente las partículas originales en C100, y en menor cantidad las de C99. La formación de la fase apatita está relacionada con la presencia y disolución de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P en estas muestras, se observa una disminución de la intensidad de los picos de DRX de esta fase, mientras que la intensidad de los picos de la fase  $\beta$ -C<sub>3</sub>P se mantienen o aumentan, lo que indica una pobre o nula disolución de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P.

Los difractogramas de la muestra C95 y C40, Figura 7.8 (c) y (d), no presentan cambios durante el transcurso del experimento, la intensidad de los picos de la fase apatita que está presente desde la muestra inicial permanece aproximadamente constante. Estos resultados, no coinciden con la evidencia de un proceso de precipitación derivada de la disminución del contenido iónico luego de la primera semana, Figura 7.7, esto podría deberse a que si hay un producto de precipitación no se presenta en cantidades suficientes o no tiene la suficiente cristalinidad como para ser detectadas por DRX. En las imágenes de MEB de estos polvos, Figura 7.11 y 7.12, no se observan partículas que puedan asociarse con un producto de precipitación.

Los resultados obtenidos están de acuerdo con trabajos anteriores que publican la mayor reactividad del  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P respecto a la pobre reactividad del  $\beta$ -C<sub>3</sub>P.

El efecto positivo de la presencia de iones de Si en solución sobre la nucleación de apatita publicado por varios autores<sup>(13,14)</sup> no es evidente en estos experimentos, puesto que los materiales, C40 y C95 con contenido de Si, aunque presentaron liberación de Si a la solución en la primera semana y una disminución brusca de la concentración de



iones Ca y P en la segunda semana no se evidenció la presencia de un precipitado de apatita.

Los materiales estudiados presentaron diversos grados de biodegradabilidad, no se detectó ningún producto, ni sólido, ni en solución que pueda considerarse nocivo o que pueda restringir su aplicación como biomaterial.

#### **7.4 Estudios *in vitro* en SFA**

Se estudió la bioactividad de los materiales mediante estudios *in vitro* de muestras sinterizadas en forma de disco en contacto con el suero fisiológico artificial (SFA) a pH 7,4 y 36,5°C. Se analizó la liberación de iones al medio, la evolución de las fases y los cambios microestructurales de la superficie de las muestras con el tiempo de exposición a la solución. Los detalles experimentales se presentan en el capítulo 3.

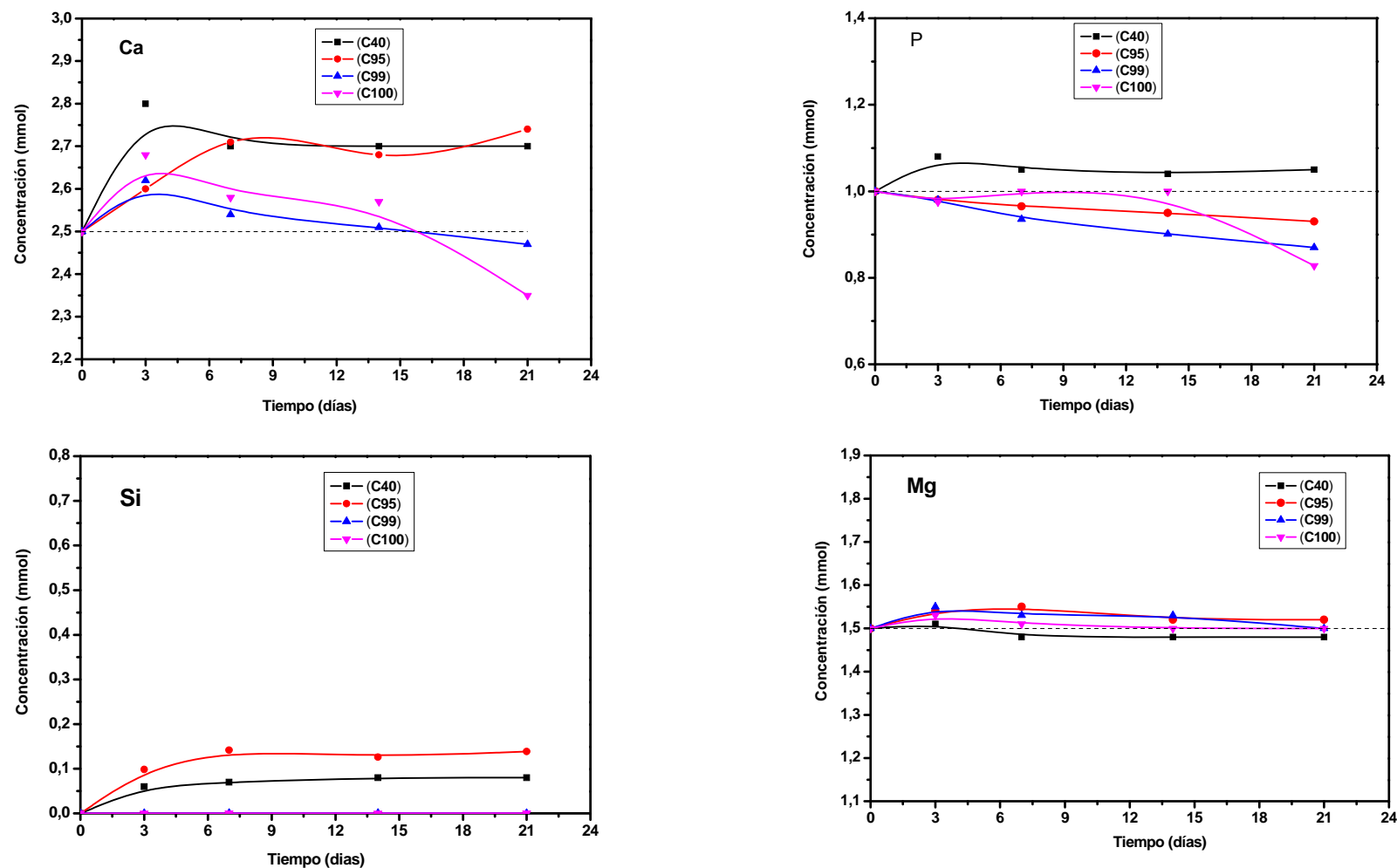
Las barras sinterizadas según el procesamiento descrito en el apartado 7.2 se cortaron en forma de discos de  $6 \pm 1$  mm de diámetro y  $2 \pm 0.2$  mm de espesor. El peso de los discos fue de  $0,19 \pm 0,01$  g para C40 y C99;  $0,15 \pm 0,01$  g para C100 y  $0,21 \pm 0,01$  para C95.

##### **7.4.1 Perfiles de liberación de iones**

Los perfiles de liberación de las especies iónicas de Si, Ca, Mg y P en el SFA a  $36,5 \pm 0,5$  ° C se presentan en la Figura 7.13. El cambio de peso de las muestras durante el experimento fue inferior al error experimental ( $\pm 0,3$  mg)

En todos los casos tiene lugar un aumento inicial en el pH desde 7,4 hasta 7,7 y posteriormente se mantiene en este valor durante todo el experimento.

En los resultados se observa que en general hay evolución de iones de Ca y Si y disminución de iones de P, mientras que la concentración de Mg no cambia en ninguno de los experimentos.

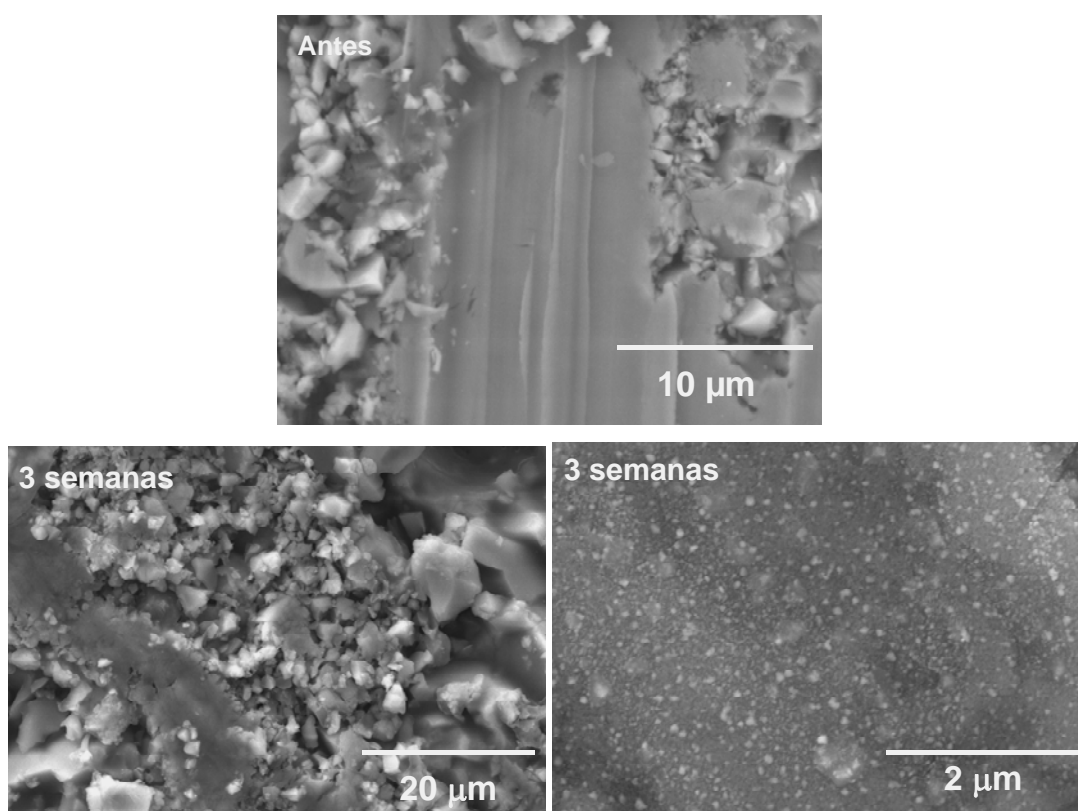


**Figura 7.13.** Variación de la concentración de iones calcio, magnesio, fósforo, y silicio con el tiempo de inmersión en suero fisiológico artificial a  $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Los valores fisiológicos en el plasma humano están incluidos como líneas punteadas. Los errores en los análisis son inferiores al 5% en todos los casos.

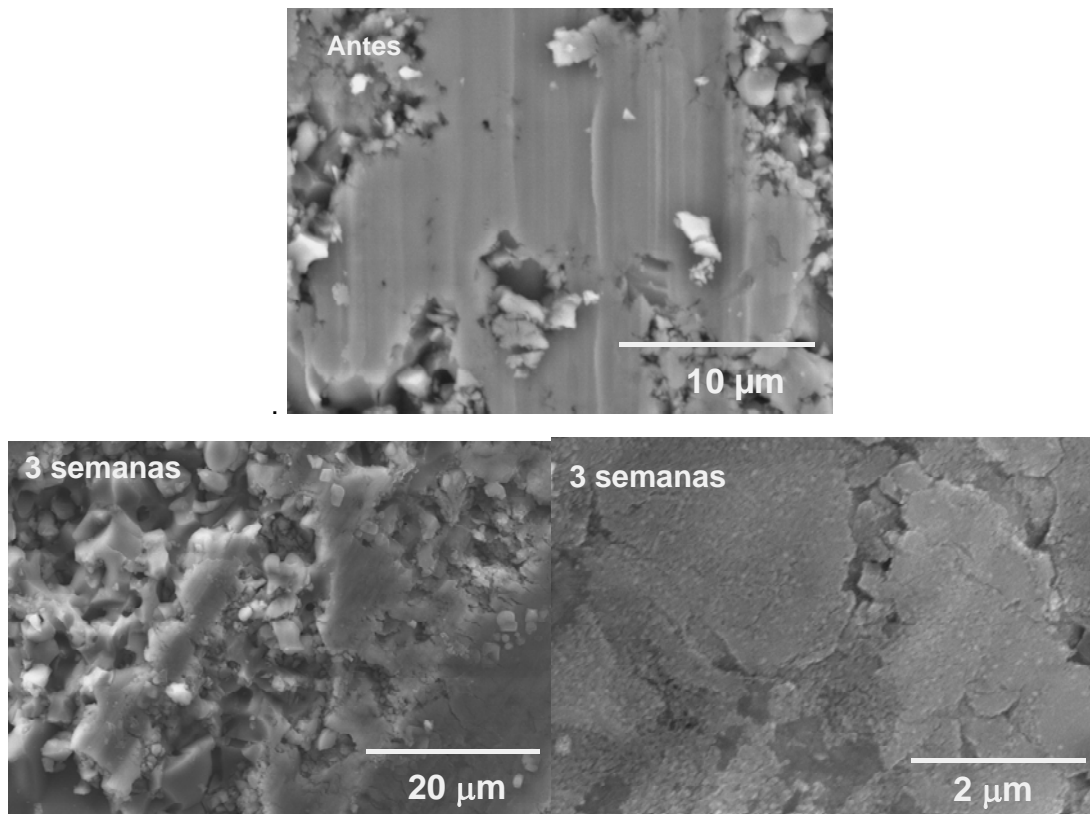
#### 7.4.2 Caracterización microestructural

Las Figuras 7.14 a 7.17, muestran respectivamente las imágenes de MEB-EC de las superficies de las biocerámicas antes y después de la inmersión en SFA durante 3 semanas. No se muestran imágenes a 1 y 2 semanas debido a que no se observan cambios apreciables respecto de las del inicio de la experimentación.

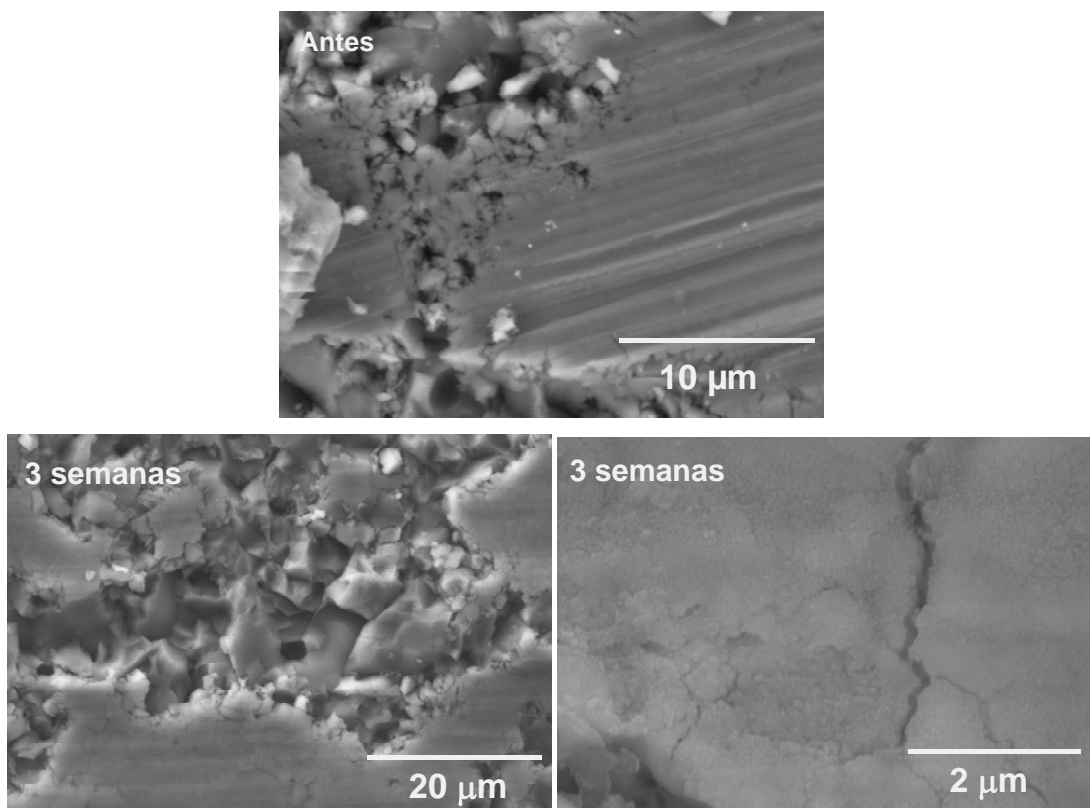
La observación de las imágenes de MEB-EC de las muestras revela la presencia de algunas diferencias en la superficie después de la interacción con el SFA. En todos los materiales se aprecia la formación de un precipitado (microfotografías a altos aumentos); sin embargo, hay diferencias significativas en la homogeneidad, apariencia y porcentaje de área cubierta por el precipitado (microfotografías a bajos aumentos). Este comportamiento se debe a las diferencias en microestructura que presentan las muestras. Más adelante se realiza una discusión más pormenorizada de este comportamiento.



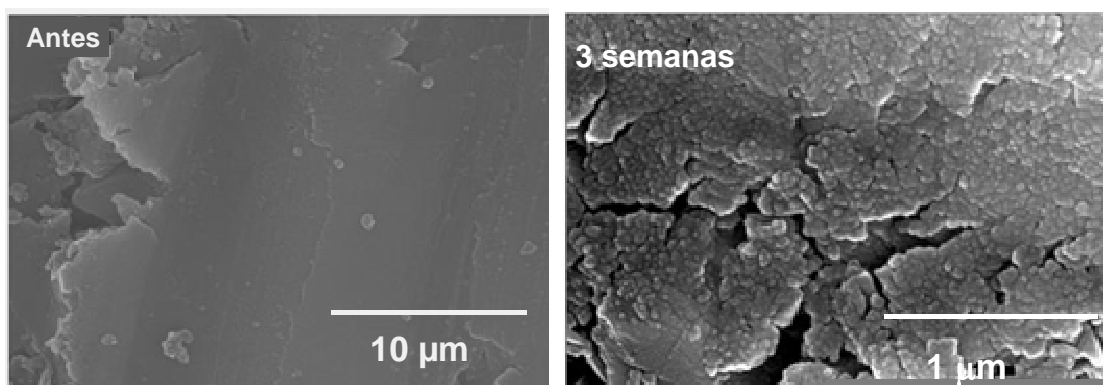
**Figura 7.14.** Imágenes MEB-EC de las superficies del material C100 antes del ensayo “recién sinterizados” y después de 3 semanas de inmersión en SFA, a 36.5 °C



**Figura 7.15.** Imágenes de MEB-EC de las superficies de la biocerámica C99 antes del ensayo “recién sinterizados” y después de 3 semanas de inmersión en SFA, a 36.5 °C.

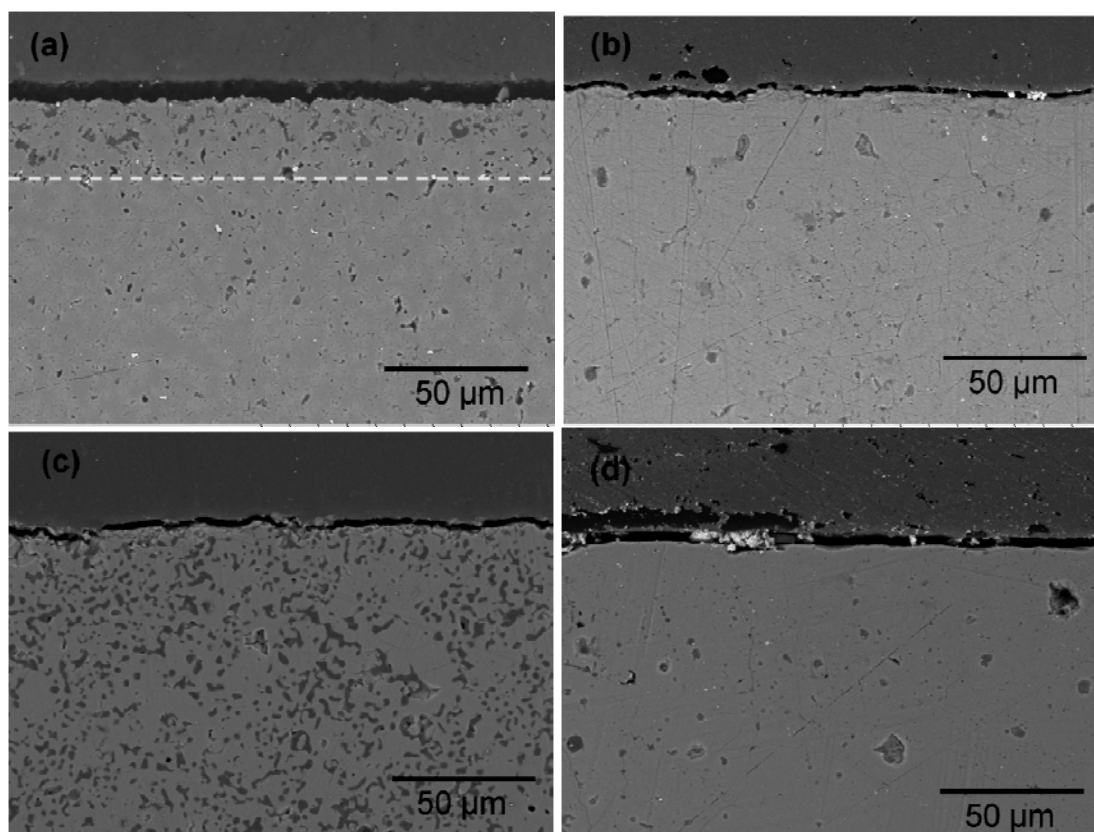


**Figura 7.16.** Imágenes de MEB-EC de las superficies de la biocerámica C95 antes del ensayo “recién sinterizados” y después de 3 semanas de inmersión en SFA, a 36.5 °C.



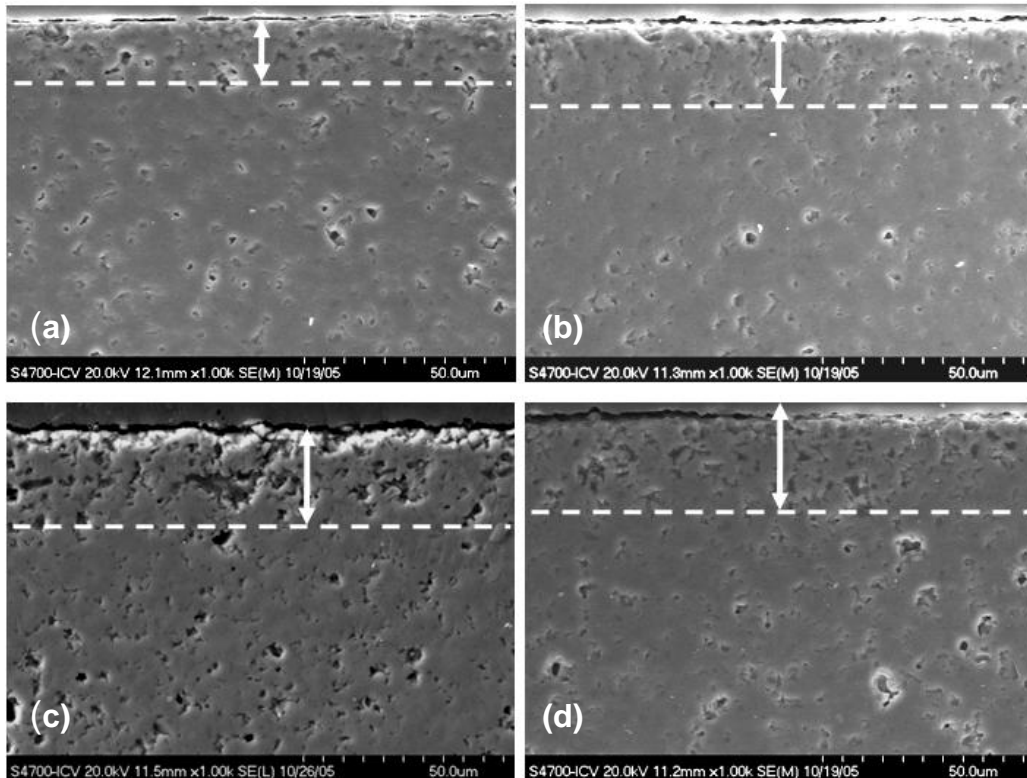
**Figura 7.17.** Imágenes de MEB-EC de las superficies de la biocerámica C40 antes del ensayo “recién sinterizados” y después de 3 semanas de inmersión en SFA, a 36.5 °C.

La Figura 7.18 presenta las micrografías de las secciones transversales de las muestras de los materiales después de tres semanas de inmersión en SFA. Solo en la muestra C40 se observa el límite del perfil de reacción hacia el interior de la muestra. En la muestra C99 se encuentran algunas zonas que presentan degradación y que puede asociarse a la interacción con el SFA.

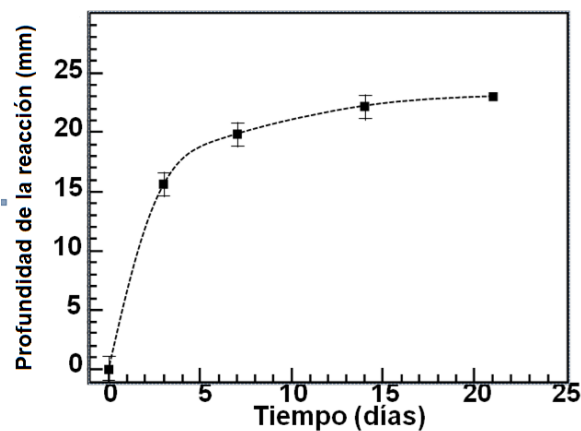


**Figura 7.18.** Micrografías de MEB de las secciones transversales de las interfaces de las muestras con el SFA después de 21 días de inmersión en SFA. (a) C40, (b) C95, (c) C99 y (d) C100. El detalle en C99 muestra la degradación en la superficie.

En la Figura 7.19 se muestran las micrografías de los perfiles de la muestra C40 a diversos tiempos de inmersión y en la Figura 7.20 se representa la relación entre el tiempo de inmersión y el espesor de la capa porosa desarrollada en la superficie del sustrato de cerámica de la muestra C40. La velocidad de reacción cambia drásticamente, desde 5 mm/día los 3 primeros días de inmersión hasta 0,8 mm/día después de 3 días de inmersión. Estas medidas revelan que la cinética de formación de la capa porosa no depende linealmente del tiempo, lo que induce a pensar que es un fenómeno de difusión más o menos complejo.



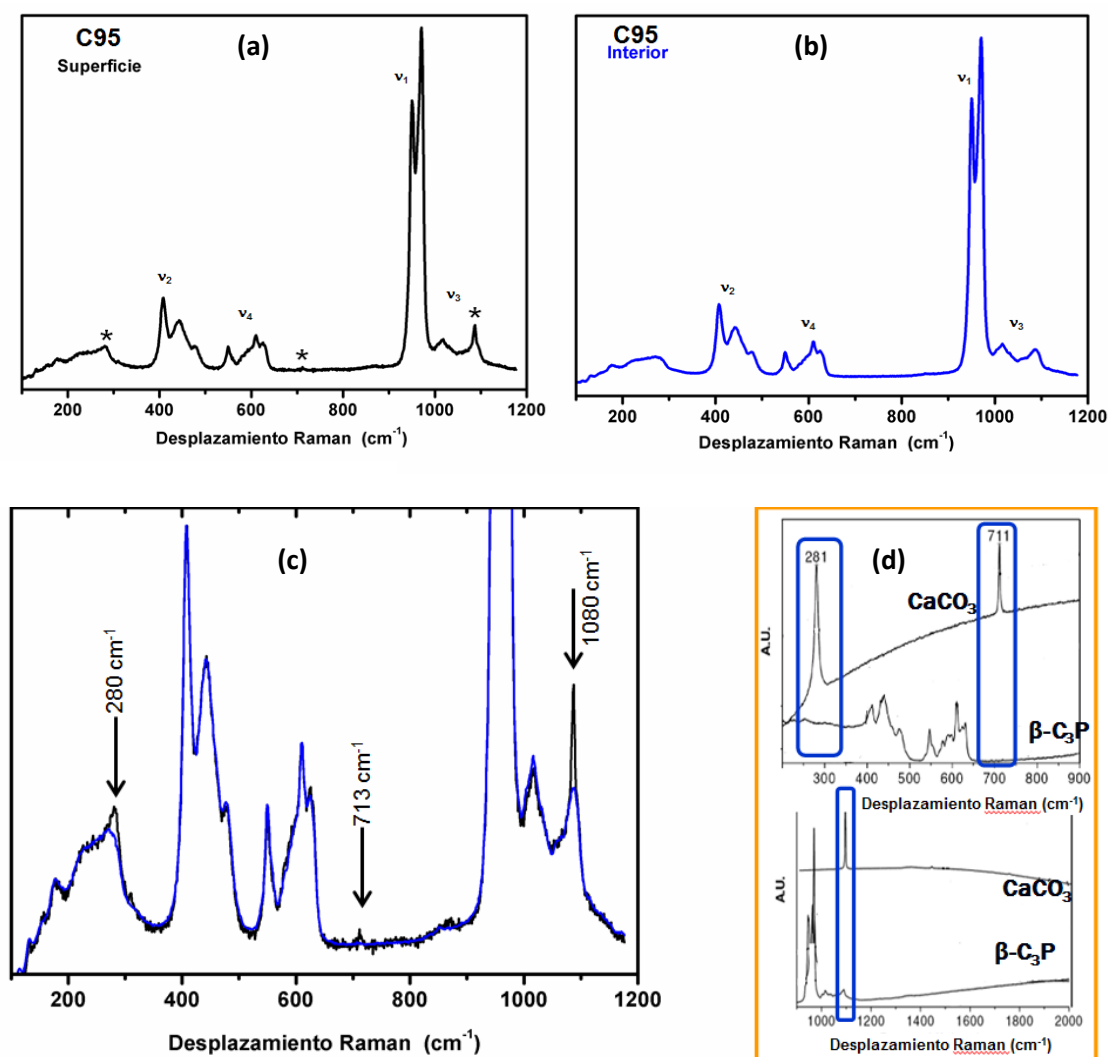
**Figura 7.19.** Evolución de la alteración de la interfase de la muestra C40 con el tiempo de inmersión en SFA después de (a) 3, (b) 7, c)14 y (d) 21 días.



**Figura 7.20.** Cambio en el espesor de la capa porosa formadas como una función del tiempo de inmersión en SFA.

### 7.4.3 Análisis de Espectroscopía Raman

Con el fin de caracterizar la capa de precipitado formado sobre las muestras luego de la inmersión en el SFA, se realizó un análisis mediante espectroscopía Raman. El análisis consistió en un barrido desde la capa superficial hasta 10 micras dentro de la muestra, con el fin de observar los posibles cambios en el espectro Raman.



**Figura 7.21.** Espectros Raman obtenidos en la muestra C95 después de inmersión en SBF durante 3 semanas. a) Sobre la superficie de la muestra, b) 10 micras adentro de la muestra, c) comparación de los dos espectros, d) espectros de la calcita y el  $\beta\text{-C}_3\text{P}$  como publicados en la literatura.

En las Figura 7.21 (a) y (b) se presentan dos de los espectros obtenidos en la muestra C95, uno en la superficie del material y el segundo 10 micras en el interior de la

muestra. Los espectros obtenidos son similares al obtenido para ese material en la caracterización realizada durante su síntesis, Figura 5.19, y son típicos del  $\beta$ -C<sub>3</sub>P. Una observación detallada de los dos espectros, Figura 7.21 (c), muestra pequeñas diferencias, en el espectro obtenido en la superficie aparecen 3 pequeños picos a 280, 713 y 1080 cm<sup>-1</sup> que no están presentes en el del interior del material. Estos picos han sido asignados a vibraciones de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> y en particular al carbonato de calcio.

Estos resultados nos permiten suponer que los pequeños nódulos que se encuentran sobre la superficie de estos materiales corresponden a carbonato de calcio, y que pueden hacer parte de una fase previa antes de la precipitación de la apatita, lo que coincide con lo propuesto recientemente por Magallanes y col.

#### **7.4.4 Discusión de los resultados experimentales del estudio de la bioactividad**

La interacción de los materiales con la solución de SFA se puede resumir de la siguiente manera:

En todos los casos se presentó una leve liberación de iones Ca durante los primeros días de experimentación, Figura 7.7. Los materiales con contenidos de Si y Mg en su composición, C40 y C95, presentaron una mayor liberación no solo de iones de Si, sino de Ca y P, las concentraciones alcanzadas a los tres días se mantuvieron durante el resto del experimento.

La concentración de iones Mg se mantuvo constante en todos los materiales y a todos los tiempos de la experimentación.

Los cambios en las concentraciones en ninguno de los casos sobrepasó los 0,2 milimoles, con lo que el cambio en peso en la muestra es como máximo del orden de las décimas de mg, lo que está de acuerdo con los cambios de peso experimentales que fueron inferiores al error experimental de 0,3 mg.

En las micrografías de las superficies de las muestras luego de las 3 semanas de experimentación, se aprecia una mínima alteración. En el material C100, Figura 7.14, apenas si se observan algunos núcleos de precipitación que no llegan a desarrollarse. En el resto de materiales, se observa una capa muy dispersa de partículas globulares con diámetros del orden de las centésimas de micra en C99 y C95 (Figuras 7.15 y



7.16) respectivamente y del orden de las décimas de micra en el caso de C40 (Figura 7.17).

Las micrografías de los perfiles de las muestras después de tres semanas de inmersión en SFA (Figura 7.18) presentan diferencias entre las capas de reacción. La muestra C40 presenta una mayor alteración por la inmersión en SFA, se observa una capa paralela a la interfaz de SFA-cerámica, con una estructura porosa, producto de la degradación o disolución. En la muestras C99 se observa una degradación que puede deberse a procesos de disolución. Al contrario, en las muestras de las otras composiciones no se aprecian alteraciones significativas al mismo nivel.

La escasa formación de capa de apatita, o de cualquier otro precipitado a las tres semanas de duración del experimento, en todos los materiales era presumible si se tenían en cuenta los resultados del estudio de biodegradabilidad. En el estudio con Tris-HCl, se tienen condiciones que favorecen la cinética de los procesos de solución-precipitación, como son la presencia de agitación y la mayor superficie específica, sin embargo, solo hasta la semana 8 se tuvo evidencias de la formación un producto precipitado.

### **7.5 Simulación termodinámica del proceso de disolución en Tris-HCl y SFA**

Con el fin de explicar los resultados experimentales obtenidos en los dos estudios *in vitro* se realizó una simulación termodinámica del proceso de disolución mediante el software HSC.<sup>(30)</sup> El programa HSC usa el método de minimización de energía libre de Gibbs para calcular la composición en el equilibrio de la mezcla de dos o más fases. La simulación realizada se limita a la termodinámica química de los componentes puros, es decir no incluye la posibilidad de formación de soluciones sólidas, ni el proceso de nucleación.

Es importante explicar que el software HSC usa solo datos termodinámicos ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$ ,  $\Delta S$  y  $C_p$ ) para los cálculos, los cuales pueden ser menos exactos para el estudio de la solubilidad que los datos experimentales obtenidos directamente de análisis químicos de soluciones en equilibrio con una sal pura, tal como lo explica J.C. Elliot <sup>(31)</sup>. Sin embargo, es difícil la simulación de sistemas complejos con este tipo de datos debido a su poca disponibilidad.

Se simularon por tanto los materiales puros  $\beta$ -C<sub>3</sub>P,  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P y diópsido. El material C40, conformado por  $\beta$ -C<sub>3</sub>P y CMS<sub>2</sub>, se simuló como una mezcla física de estos dos compuestos.

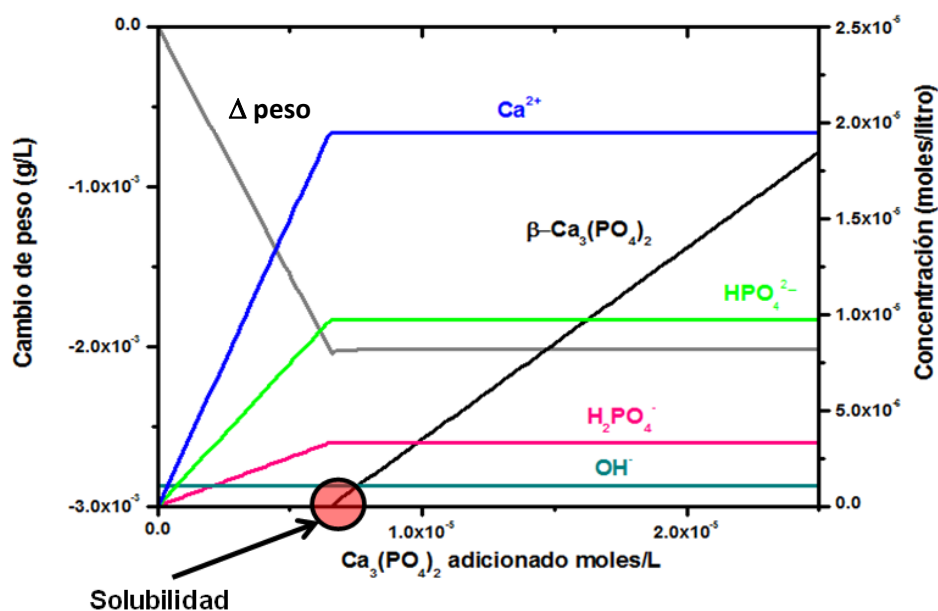
La principal diferencia de los dos estudios realizados desde el punto de vista de la simulación es la composición de la solución inicial y por tanto de las especies consideradas en la modelización de la fase acuosa.

Para la simulación del proceso de disolución en Tris-HCl, las especies consideradas en la modelización de la fase acuosa fueron: H<sub>2</sub>O, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, Ca<sup>2+</sup>, CaOH<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, MgOH<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>, HSiO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>. Se simuló además el tampón a 7,40.

Para el estudio del proceso de disolución en SFA, se simuló la solución de SFA con una composición de Na<sup>+</sup> 142.0, K<sup>+</sup> 5.0, Mg<sup>2+</sup> 1.5, Ca<sup>2+</sup> 2.5, Cl<sup>-</sup> 147.8, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 4.2, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 1.0 y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> mol/m<sup>3</sup>. Por tanto, las especies consideradas en la modelización de la fase acuosa en este caso fueron: H<sub>2</sub>O, Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, MgOH<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, OH<sup>-</sup>, H<sup>+</sup>, CaOH<sup>+</sup>, HSO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, HSiO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup>. ), se simuló además el tampón a 7,40

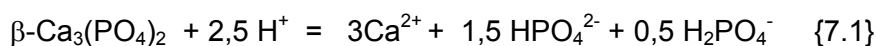
Los datos de entrada para cualquier sistema es la composición inicial de las especies en cada una de las fases consideradas. Para el caso del estudio de la disolución de un compuesto en una solución, los datos de entrada son la composición inicial de la solución, mientras que la cantidad de compuesto se usa como variable.

A manera de ejemplo, en la Figura 7.22, se presentan los resultados del estudio de disolución del  $\beta$ -C<sub>3</sub>P en una solución tampón a pH 7,4. La solubilidad es aquella cantidad de compuesto a la cual éste aparece como producto en el equilibrio, en el ejemplo este valor es  $6,65 \cdot 10^{-6}$  mol/L que equivale a 2,06 mg/L. La concentración de iones a la máxima disolución se pueden leer directamente sobre el eje “y” de la derecha. Adicional a los resultados del programa, se ha calculado el cambio de peso de la muestra como función de la cantidad de compuesto disuelta.



**Figura 7.22** Simulación termodinámica del proceso de disolución del  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

Aunque los valores de solubilidad se presentan comúnmente en g/L, la Figura 7.22 se ha dibujado en mol/L con el fin de apreciar la evolución de los iones en solución con respecto al fosfato adicionado. Esta relación permite determinar el mecanismo de disolución. Por ejemplo, las pendientes de las curvas de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  son 3; 1,5 y 0,5 respectivamente, con lo que se deduce que el mecanismo de disolución está regido por la reacción:



Las características de estas curvas son de gran utilidad para estudiar mecanismos más complejos, como es el caso de materiales bifásicos como C40 y ante la posibilidad de la presencia de productos de precipitación.

Teniendo en cuenta que los resultados experimentales de liberación de iones, MEB-EC y DRX demuestran que en algunos materiales además de la disolución, ocurre simultáneamente un proceso de precipitación de apatita, mientras que en otros solo hay disolución, se realizó un estudio de simulación termodinámica con dos escenarios:

**Escenario 1.** No se considera la precipitación de hidroxiapatita. Este escenario simula las siguientes posibilidades: a) la cinética de la precipitación de Hap es muy lenta respecto a las demás etapas del proceso, y/o b) la termodinámica de la nucleación de Hap es desfavorable.

**Tabla 7.3** Resultado de la simulación termodinámica en el proceso de disolución –precipitación de Hap en Tris-HCl y en SFA.

Material	Solubilidad		Precipitación Hap		Concentración iónica (mmol/L)				
	(mmol/L)	(g/L)	(mmol/L)	(g/L)	Ca <sup>2+</sup>	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	HSiO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Mg <sup>2+</sup>
<b>Solución tamponada sin formación de HAP</b>									
β- C <sub>3</sub> P	6,65x10 <sup>-3</sup>	2,06x10 <sup>-3</sup>			1,95x10 <sup>-2</sup>	9.71x10 <sup>-3</sup>	3,32x10 <sup>-3</sup>	-	-
α- C <sub>3</sub> P	1,35x10 <sup>-2</sup>	4,18x10 <sup>-3</sup>			4.03x10 <sup>-2</sup>	2.01x10 <sup>-2</sup>	6.82x10 <sup>-3</sup>	-	-
CMS <sub>2</sub>	1,87x10 <sup>-1</sup>	4,05x10 <sup>-2</sup>			1,87x10 <sup>-1</sup>	-	-	3.73x10 <sup>-1</sup>	1,87x10 <sup>-1</sup>
C40 <sup>(b)</sup>	β:3,9x10 <sup>-6</sup> CMS <sub>2</sub> :1,5x10 <sup>-1</sup>	β: 1,21x10 <sup>-3</sup> CMS <sub>2</sub> : 3,25x10 <sup>-2</sup>			1,5x10 <sup>-1</sup>	4,61x10 <sup>-4</sup>	1,29x10 <sup>-4</sup>	2,97x10 <sup>-1</sup>	1,5x10 <sup>-1</sup>
<b>SFA sin formación de Hap</b>									
α-C <sub>3</sub> P - β-C <sub>3</sub> P	No espontáneo <sup>(c)</sup>				1	4,03x10 <sup>-5</sup>	2,08x10 <sup>-5</sup>	-	1,5
C40 <sup>(b)</sup>	β: no espontáneo D: 2.92x10 <sup>-5</sup>				1,03	3,81x10 <sup>-5</sup>	1,94x10 <sup>-5</sup>	0,058	1,53
<b>Solución tampónada con formación de HAP</b>									
α-C <sub>3</sub> P - β-C <sub>3</sub> P	>3,23	> 1	1,93 <sup>(a)</sup>	0,97 <sup>(a)</sup>	~ 0	0,44 <sup>(a)</sup>	0,206 <sup>(a)</sup>	--	--
CMS <sub>2</sub>	0,187	--	n. p.	-	0,19	~ 0	~ 0	0,37	0,19
C40 <sup>(b)</sup>		> 1 g/L	0,87 <sup>(a)</sup>	0,44 <sup>(a)</sup>	0,015 <sup>(a)</sup>	0,005 <sup>(a)</sup>	~ 0	0,88 <sup>(a)</sup>	0,44 <sup>(a)</sup>
<b>SFA con formación de Hap</b>									
α-C <sub>3</sub> P- β-C <sub>3</sub> P	>3,23	> 1g/L	2,4		~ 0	8,9x10 <sup>-2 x</sup>	5,3x10 <sup>-2 x</sup>	---	1.5
C40 <sup>(b)</sup>	C <sub>3</sub> P > 1g/L D: 3,3x10 <sup>-5</sup>		1,2		0,454 <sup>x</sup>	~ 0 x	~ 0 x	0,102 <sup>x</sup>	1,55

<sup>(a)</sup> Los valores corresponden para una disolución de 1g/L de muestra. <sup>(b)</sup> En el material bifásico C40 se presenta en forma separada la disolución en cada una de las fases presentes en el material. <sup>(c)</sup> El producto de solubilidad obtenido desde pruebas experimentales de disolución predice la disolución del α-C<sub>3</sub>P en SFA.

**Escenario 2.** Se considera la posibilidad de precipitación de hidroxiapatita. Esta situación se presenta si la cinética de la precipitación es mayor o del mismo orden que la disolución y la termodinámica de la nucleación de Hap es espontánea.

Los resultados de la disolución de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P,  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, CMS<sub>2</sub> y de una mezcla  $\beta$ -C<sub>3</sub>P - CMS<sub>2</sub> (40:60), en 1L de solución tamponada a pH 7,4 y en una solución simulada de SFA, en los dos escenarios se presentan en la Tabla 7.3. Se realizó la simulación del CMS<sub>2</sub> puro con el fin de evaluar el comportamiento de las fases,  $\beta$ -C<sub>3</sub>P y CMS<sub>2</sub> en la mezcla respecto de su comportamiento en forma separada.

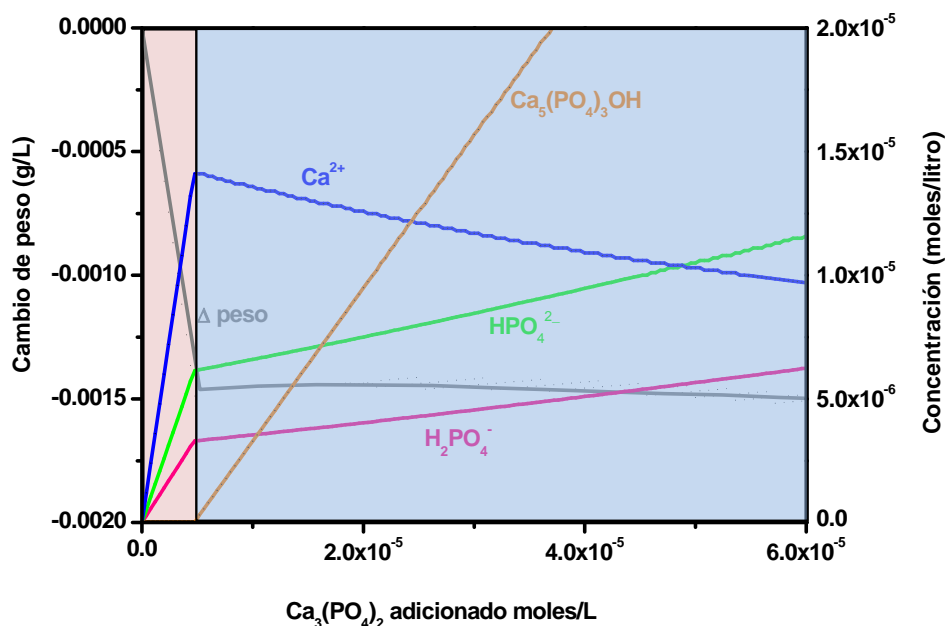
De los resultados de la Tabla 7.3 se destaca que el el proceso de disolución de fosfatos/precipitación de Hap es muy favorable, de manera que se superan los valores experimentales usados en este trabajo (1g/L). En estos casos, los valores de precipitación de Hap y la concentración de los iones en solución para los fosfatos tricálcicos se han calculado suponiendo que todo el material ha reaccionado, o sea para una disolución de 1g/L.

También se debe destacar que la disolución de la fase  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P no es espontánea, lo que contradice lo publicado por diversos investigadores. Esto puede explicarse debido a que como ya se mencionó, los cálculos en el HSC se realizan exclusivamente con datos termodinámicos y pueden no tener la misma exactitud que los datos experimentales de procesos de disolución.

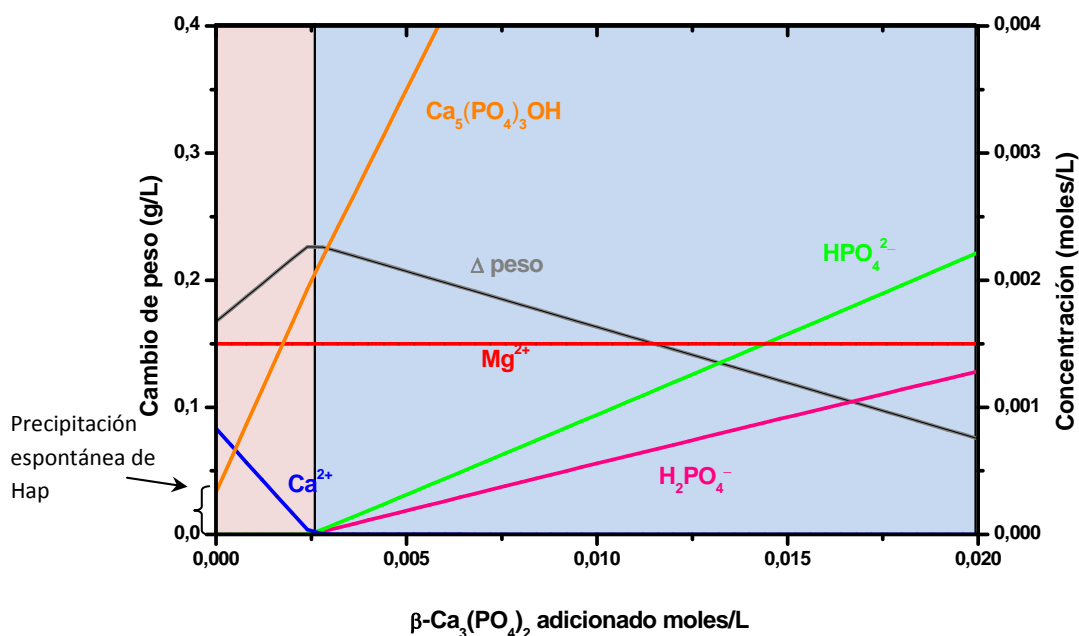
#### **7.5.1 Mecanismos de disolución de C<sub>3</sub>P-precipitación de Hap**

Se estudió el mecanismo de los procesos de disolución, usando las curvas de evolución de las fases con respecto a la cantidad de compuesto, tal como se explicó en el caso de la Figura 7.22, con el fin de aclarar las dudas generadas de la comparación de los datos experimentales y de la simulación, especialmente en lo que tiene que ver con la espontaneidad de los procesos de disolución de material – precipitación de apatita.

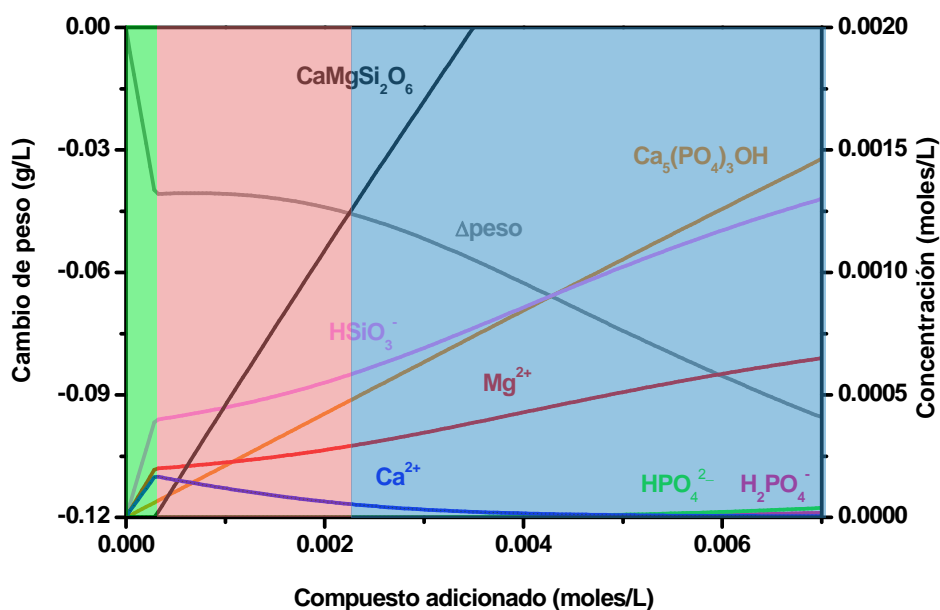
La simulación del proceso de disolución-precipitación se presenta en las Figuras 7.23 a 7.25.



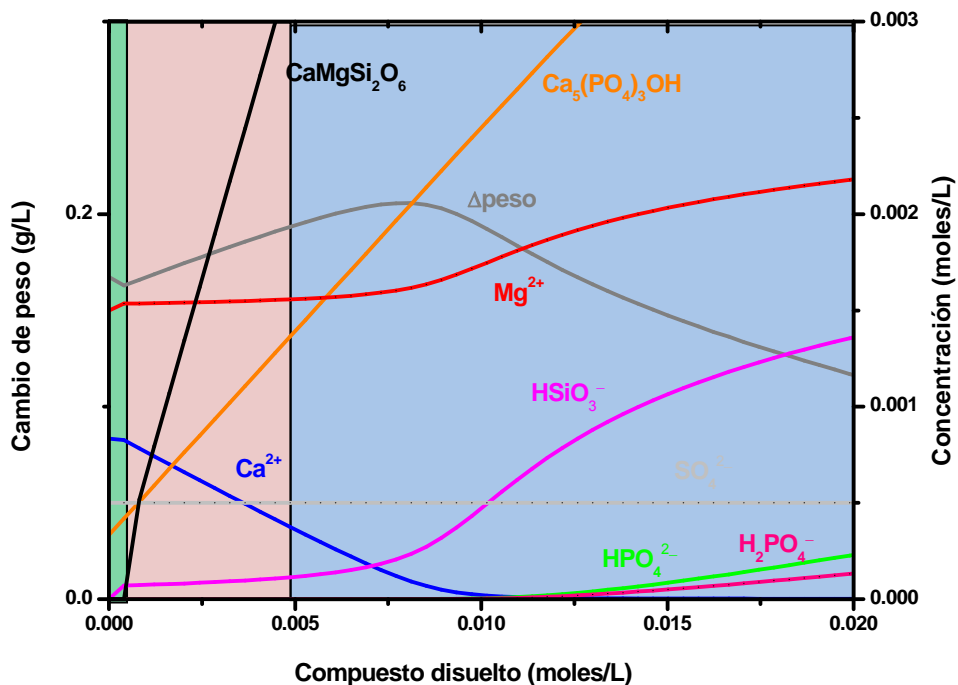
**Figura 7.23.** Simulación del proceso de disolución de  $\beta$ - y  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P en solución Tris-HCl. Etapa 1: recuadro rojo, disolución del C<sub>3</sub>P. Etapa 2, recuadro azul: disolución C<sub>3</sub>P, precipitación de Hap.



**Figura 7.24.** Simulación del proceso de disolución de  $\beta$ - y  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P en SFA. Etapa 1: recuadro rojo, Precipitación de Hap. Etapa 2: recuadro azul, disolución C<sub>3</sub>P-precipitación Hap.

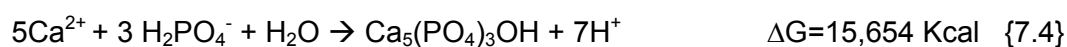
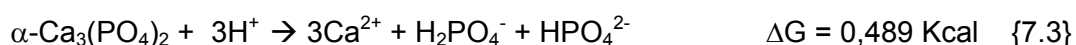
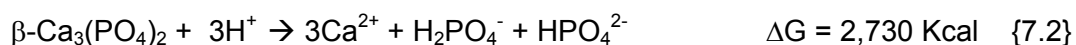


**Figura 7.25.** Simulación del proceso disolución de C40 en Tris-HCl. Etapa 0: recuadro verde, disolución de dióxido. Etapa 1, recuadro rojo: disolución  $C_3P$ -precipitación de Hap. Etapa 3: cuadro azul, disolución  $C_3P$ -precipitación de Hap.



**Figura 7.26.** Simulación del proceso de disolución de C40 en SFA. Etapa 1: recuadro verde, disolución de dióxido. Etapa 2, recuadro rojo, precipitación de HAp. Etapa 3: recuadro azul. Disolución de  $C_3P$  y dióxido-precipitación de Hap.

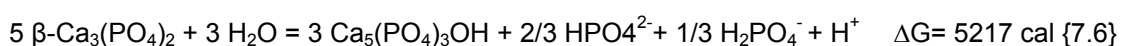
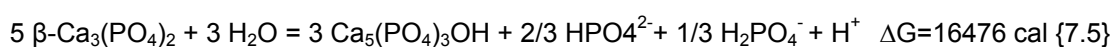
De los resultados de la simulación, se deduce que aunque la disolución de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P sea más favorable que para el caso de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P (Tabla 7.3) hasta adiciones prácticas, tales como las usadas en los experimentos, el mecanismo de disolución-precipitación de HAp es idéntico. Durante todo el proceso se presentan dos reacciones en forma simultánea y competitiva: la disolución de C<sub>3</sub>P y la precipitación de Hap. Reacciones {7.2} a {7.4}.



El mecanismo del proceso de interacción de los C<sub>3</sub>P con las dos soluciones, Figuras 7.23 y 7.24, se puede resumir en dos etapas:

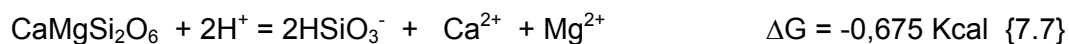
**Etapas 1. Disolución de C<sub>3</sub>P ó de Precipitación de Hap (Recuadro rojo):** Al inicio del proceso, predominará uno de estos dos procesos, en el caso de la solución de Tris-HCl, debido a los bajos contenidos iónicos, predomina la reacción de disolución del C<sub>3</sub>P {7.2} y/o {7.3}, mientras que en el caso de la solución de SFA, debido a los altos contenidos iónicos que superan el producto de solubilidad de la HAp predomina la reacción de precipitación de Hap {7.4}. El cambio en la concentración de los iones en esta etapa es inverso en las dos soluciones.

**Etapas 2. Disolución del C<sub>3</sub>P/precipitación de HAp (Recuadro azul):** A mayores cantidades de compuesto, empieza una segunda etapa donde no predomina ninguno de los dos procesos en forma individual. El proceso está determinado por la reacción global de disolución de C<sub>3</sub>P-precipitación de Hap, en los dos casos disminuye la concentración de Ca<sup>2+</sup> y aumenta la concentración de los iones de fósforo, H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> y HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Si se tiene en cuenta las pendientes de las concentraciones respecto a la cantidad de C<sub>3</sub>P, la reacción global es del tipo {7.5} y/o {7.6}. Esta etapa se prolonga hasta alcanzar el equilibrio a muy altas cantidades de transformación de C<sub>3</sub>P en HAp.





**Etapas 0. Disolución de dióxido de silicio.**(Recuadro verde, Figuras 7.25 y 7.26) En el caso del material C40, la presencia de dióxido de silicio en el material y la ausencia de iones de Si en las dos soluciones, favorece su disolución antes de las dos etapas mencionadas anteriormente.



Esta reacción produce la liberación de iones  $\text{HSiO}_3^-$  y  $\text{Mg}^{2+}$  a la solución, que no alteran significativamente el proceso de disolución del fosfato tricálcico. Sin embargo, el aporte de iones  $\text{Ca}^{2+}$  a la solución afectará de manera considerable el proceso, por el llamado efecto de ión común. La etapa inicial donde predomina la disolución del  $\text{C}_3\text{P}$ , reacciones {7.2} y {7.3}, se verá menos favorecida y posiblemente se ralentizará. Sin embargo, en la segunda etapa se favorece la reacción de disolución  $\text{C}_3\text{P}$ -precipitación de HAp de las reacciones {7.5} y {7.6}.

### 7.5.2 Comparación de los resultados experimentales con los de la simulación termodinámica.

#### *Ensayos de solubilidad en Tris-HCl*

Si se comparan las curvas de evolución de los iones en el experimento en Tris-HCl para los materiales estudiados, Figura 7.7, con las curvas del modelo, Figura 7.23 y 7.25 se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- La primera etapa de la Figura 7.23, corresponde con los resultados obtenidos durante la primera semana del experimento de las composiciones C99 y C100. Durante esta etapa no parece haber grandes diferencias entre el comportamiento de las fases  $\alpha$ - y  $\beta$ -  $\text{C}_3\text{P}$ , como se puede deducir del similar comportamiento de la evolución de iones al medio de las dos muestras C99 y C100, que tienen diferentes proporciones de estas dos fases.
- La segunda etapa, para C99 y C100, durante la cual disminuye la concentración de Ca y aumenta la concentración de los iones de fósforo y que corresponde con el comportamiento a partir de la semana 1, se inicia con la precipitación de Hap, Figura 7.23. La no detección de la apatita por DRX en las semanas 2 y 4 de experimentación puede deberse a la poca cantidad y/o la poca cristalinidad de la apatita formada. Después de 8 semanas la precipitación de apatita es

suficientemente alta como para que se detecte por DRX. En esta etapa, si se aprecia una diferencia significativa entre la fase  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P y la fase  $\beta$ -C<sub>3</sub>P. A mayores contenidos en la composición de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P tienen lugar mayores precipitaciones de Hap, C100>C99>C95.

- c) El modelo de la Figura 7.25, predice el comportamiento de las muestras con dióxido en su composición, después del rápido aumento de la concentración durante la primera semana, que corresponde con la etapa 0. La concentración de todos los iones permanece casi constante. Sin embargo, durante esta pseudoestabilidad se presenta precipitación de apatita. Nuevamente, la poca cantidad y poca cristalinidad de la apatita precipitada sería la responsable de que no sea detectada por DRX.

### **Ensayos en SFA**

Si se comparan las curvas de evolución de los iones en los ensayos en SFA para los materiales estudiados, Figura 7.13, con las curvas del modelo, Figura 7.24 y Figura 7.26 se pueden sacar las siguientes conclusiones:

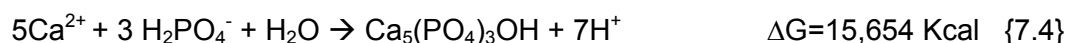
- a) La pequeña liberación de Si y la estabilidad del magnesio observada en el experimento para los materiales con dióxido, se corresponde con el modelo en las dos primeras etapas.
- b) El modelo para los materiales de C<sub>3</sub>P, no predice el ligero aumento de la concentración de iones de Ca (Figura 7.13). En C40 si predice el pequeño aumento de Ca debido a la disolución del dióxido. La disminución de la concentración iónica observada en los resultados experimentales que se presenta en los materiales sin adición de dióxido es predicha por el modelo.
- c) El modelo en todos los casos predice una disminución drástica en los contenidos de Ca y P en solución, que no se presenta experimentalmente. Las posibles explicaciones se han expuesto previamente y pueden ser una cinética muy lenta o pobre nucleación. La cinética lenta está apoyada en los resultados obtenidos en el estudio de biodegradabilidad en Tris-HCl donde solo hasta la semana 8 se pudo observar la presencia de apatita.

## 7.6 Discusión final

La simulación termodinámica muestra que el proceso de disolución en SFA de los materiales estudiados no es espontáneo sin una precipitación previa de un compuesto que disminuya la concentración de iones de Ca y de P, debido a que la concentración de iones en el SFA supera el producto de solubilidad de los componentes de estos materiales. Este hecho se refleja en los cálculos termodinámicos en una precipitación espontánea del mismo compuesto o de la Hap desde la primera interacción del compuesto con la solución. (Ver eje “y” izquierdo en las Figuras 7.24 y 7.26).

En este estudio, se ha confirmado la poca capacidad de precipitación de la Hap sobre la superficie de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, tal como ha sido publicado por distintos investigadores<sup>(19,20)</sup>. Además, se encontró que esa capacidad aumenta considerablemente en la fase  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P. Se pudo verificar mediante DRX, Figuras 7.8 (a) y (b), que la precipitación de apatita está relacionada directamente con la disolución de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P. Este comportamiento se ha relacionado con la pobre capacidad de nucleación de apatita sobre la fase  $\beta$ -C<sub>3</sub>P<sup>(21)</sup>. Sin embargo, según los resultados de este trabajo se considera que la diferencia de comportamiento se debe fundamentalmente a fenómenos cinéticos, que se derivan del efecto que puede tener la diferente solubilidad de las dos fases, y se explica en las dos soluciones por dos mecanismos diferentes, así:

El Tris-HCl inicialmente no tiene iones en solución, por lo que la posibilidad de precipitación de Hap dependerá de la cantidad de iones Ca y P que la disolución del material aporte a la solución. En la simulación se determinó que la solubilidad de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P (4,18g/L) es el doble de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P (2,06 g/L), por tanto, una simple aplicación de la teoría de las colisiones para la reacción de formación de Hap según la reacción {7.4} indicaría que si se tiene el doble de la concentración de iones de Ca<sup>2+</sup> y H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> en solución, se tendrá 2<sup>8</sup> : 256 veces más probabilidades de que se presenten choques efectivos para la formación de la Hap, y por tanto sea mucho más probable su precipitación con la disolución de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P que con la de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P.



En el caso de la interacción con SFA no aplica el mismo criterio, puesto que el contenido de iones en la solución sobrepasa el producto de solubilidad de la Hap y por

tanto se tiene inicialmente la misma posibilidad de precipitación sobre las dos fases. La diferencia se explica entonces en que el  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P es soluble en SFA mientras que la fase  $\beta$ -C<sub>3</sub>P no lo es. La precipitación inicial de Hap disminuye la concentración de iones de Ca y P en la interface de reacción y su continuidad dependerá de la llegada de nuevos iones. La disolución de la fase  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P aporta los iones necesarios en la misma interface, mientras que en la fase  $\beta$ -C<sub>3</sub>P, al no disolver, dependerá exclusivamente del transporte de iones desde el seno de la solución a través de la capa de difusión.

Los mecanismos de disolución de los diferentes materiales estudiados se han propuesto teniendo en cuenta la liberación de iones al medio (Figuras 7.7 y 7.13) los cambios morfológicos superficiales que han sufrido cada uno de los especímenes durante el período de interacción con la solución tamponada de Tris-HCl y el SFA ( Figuras 7.9 a 7.12 y 7. 14 a 7.17) y el cambio de la composición de fases establecido por DRX (Figura 7.8) en los polvos extraídos de la solución de Tris-HCl después de cada experimento. El cálculo de degradación de estos materiales no se puede realizar calculando solo el cambio de peso, puesto que es un proceso de disolución-precipitación, además el cambio de peso para los materiales estudiados está por debajo del margen de error experimental.

Los resultados experimentales de la disolución de los materiales en las dos soluciones, pueden ser explicados con los mecanismos de disolución obtenidos por la simulación termodinámica. A excepción del comportamiento de la fase  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P en la solución de Tris-HCl, todos los demás sistemas presentan cinéticas muy lentas, por lo que en los experimentos solo ocurren las etapas iniciales previstas por el modelo.

El modelo no explica la disminución, después de la primera semana, del contenido del ión Mg<sup>2+</sup> inicialmente disuelto en el material C40 en el ensayo de Tris-HCl, Figura 7.7. Esto puede explicarse si se considera que el Mg entra en la composición de la pequeña cantidad de apatita en forma de solución sólida. La simulación se hizo con compuestos puros y no consideró la posibilidad de soluciones sólidas.

En los materiales diseñados en el sistema  $\beta$ -C<sub>3</sub>P -CMS<sub>2</sub> se favorece ligeramente la precipitación de Hap, (rápida disminución de la concentración de Ca y P para C95 y Ca para C40 en la Figura 7.7) esto puede deberse fundamentalmente a la liberación de aniones de silicio desde el dióxido, los cuales forman algunos grupos - ( $\equiv$  Si-OH)

en la superficie. Estos grupos silanol, pueden inducir la nucleación heterogénea de la apatita lo que se refleja en el brusca disminución de Ca y P.

Una variable importante en el estudio de los mecanismos de disolución-precipitación de los materiales es la fuerza iónica del medio, especialmente en la etapa de predominio de las reacciones de disolución. La disolución es mucho mayor en la solución de Tris-HCl, sin iones inicialmente, Figura 7.7, que en el caso del SFA, Figura 7.13, en la cual los contenidos iónicos superan el producto de solubilidad de la mayoría de los fosfatos de calcio y lo que dificulta los procesos de liberación de iones al medio.

Aunque los materiales estudiados no presentan una capacidad apreciable de formación de Hap en los experimentos realizados, anteriores investigaciones han demostrado que el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P es de los pocos materiales que no necesitan la formación de esta capa para lograr la unión ósea<sup>(1)</sup>, por tanto la no formación de capa en estos experimentos no es concluyente con respecto a la capacidad de unión ósea en materiales de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P.

La adición de dióxido de forma controlada en materiales de fosfato tricálcico, puede suponer un control de su biodegradabilidad y de su reabsorción de manera que se mejoren las condiciones de regeneración ósea. Especialmente si se tiene en cuenta que los productos de disolución (iones Si, Mg) presentan un rango de concentración que dará lugar a una mayor proliferación de osteoblastos (osteostimulation). Además, por medio de la ciencia de procesamiento, se pueden obtener biocerámicas de C<sub>3</sub>P/CMS<sub>2</sub> con microestructuras y morfologías controladas con el fin de mejorar la osteointegración.

## 7.7 Conclusiones

La reactividad “in vitro” de materiales densos y de polvos de fosfato tricálcico-dióxido se ha estudiado experimentalmente utilizando soluciones acelulares como el Tris-HCl y el SFA.

El contenido en dióxido en los materiales afecta el comportamiento de la interacción de los materiales con soluciones acelulares *in vitro*. Los materiales de  $\beta$ -,  $\alpha$ -,  $\alpha$ - +  $\beta$ -C<sub>3</sub>P y C<sub>3</sub>P-CMS<sub>2</sub> presentan diferentes grados de biodegradabilidad y de bioactividad.

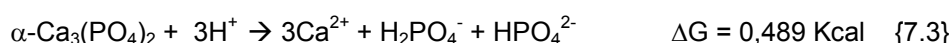
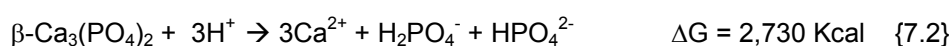
En la interfaz solución-material de las muestras de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P se forma una capa de Ap sin continuidad y difícil de caracterizar, esto se relaciona con la pobre capacidad de nucleación de Ap sobre el  $\beta$ -C<sub>3</sub>P. En la interfaz solución-material de los materiales con  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P se puede observar claramente la formación de apatita lo que confirma su mayor solubilidad.

Durante la interacción de los materiales con las dos soluciones no forman ningún producto sólido o iónico en solución que pueda considerarse nocivo o que puedan restringir la aplicación de los biomateriales desarrollados.

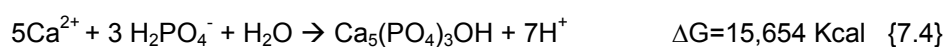
Se han realizado cálculos termodinámicos de minimización de la energía libre de Gibbs, usando el programa HSC, para simular la solubilidad de las distintas fases cristalinas presentes en las biocerámicas. El software utilizado, para explicar los resultados experimentales, ha demostrado ser una herramienta útil para establecer los mecanismos de disolución de los materiales de fosfato en las soluciones aceluareas estudiadas.

Consecuencia de los resultados experimentales y de las simulaciones realizadas se han definido los mecanismos de interacción entre los materiales de C<sub>3</sub>P, y C<sub>3</sub>P-CMS<sub>2</sub> con el Tris-HCl y SFA. El mecanismo se basa en 3 reacciones principales:

- Disolución de C<sub>3</sub>P

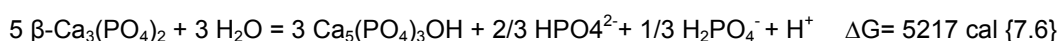
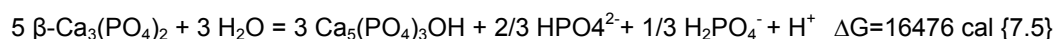


- Precipitación de apatita, {7,4}

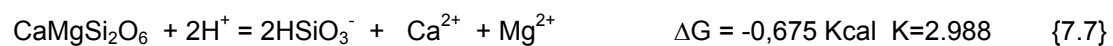


y,

- Disolución C<sub>3</sub>P-precipitación de apatita ({7.5} y {7.6}).



El predominio de una u otra reacción depende del contenido de los distintos iones en solución. La presencia de dióxido en los materiales se refleja en una etapa de disolución del dióxido {7.7} antes de las etapas anteriormente mencionadas.



Las significativas diferencias entre la reactividad del  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$  y del  $\beta\text{-C}_3\text{P}$ , y especialmente en la capacidad de formación de una capa de apatita sobre su superficie, bioactividad, que se debe fundamentalmente a fenómenos cinéticos derivados de la mayor solubilidad del  $\alpha\text{-C}_3\text{P}$ .

## Referencias:

- <sup>1</sup> S. Kotani, Y. Fujita, T. Kitsugi, T. Nakamura, T. Yamamuro, C. Ohtsuki, T. Kokubo, “Bone bonding mechanism of beta-tricalcium phosphate”, *J Biomed Mater Res*, 25, 1303–1315 (1991).
- <sup>2</sup> L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee. “Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials”, *J Biomed Mater Res*, 2, 117–141 (1972).
- <sup>3</sup> T. Kitsugi, T. Nakamura, T. Yamamuro, T. Kokubo, T. Shibuya, M. Takagi. “SEMEPMA observation of three types of apatite containing glass ceramics implanted in bone: the variance of a Ca, P-rich layer”, *J Biomed Mater Res*, 21, 1255–1271. (1987).
- <sup>4</sup> T. Kokubo, C. Ohtsuki, S. Kotani, T. Kitsugi, T. Yamamoto, “Surface structure of bioactive glass-ceramic A-W implanted into sheep and human vertebra” in G Heimke, *Bioceramics. Vol. 2*, Cologne: German Ceramic Society, 105–112 (1990).
- <sup>5</sup> T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, “Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W”, *J Biomed Mater Res*, 24, 331–343 (1990).
- <sup>6</sup> T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, T. Yamamuro, “Solutions able to reproduce *in vivo* surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W”, *J Biomed Mater Res*, 24, 721–734(1990),.
- <sup>7</sup> T. Kokubo, “Bioactive glass ceramics: properties and applications”, *Biomaterials*, 12, 155–163 (1991).
- <sup>8</sup> A. Oyane, K. Onuma, A. Ito, H. M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura, “Formation and growth of clusters in conventional and new kinds of simulated body fluids”, *J Biomed Mater Res*, 64A, 339–348 (2003).
- <sup>9</sup> A. Oyane, H. M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, T. Nakamura. “Preparation and assessment of revised simulated body fluids”, *J Biomed Mater Res*, 65A, 188–195 (2003).
- <sup>10</sup> H. Takadama, M. Hashimoto, M. Mizuno, T. Kokubo, “Round-robin test of SBF for *in vitro* measurement of apatite-forming ability of synthetic materials”, *Phos Res Bull*, 17, 119–125 (2004).
- <sup>11</sup> T. Kokubo, H. Takadama, “How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?”, *Biomaterials*, 27, 2907–2915 (2006).



- <sup>12</sup> T. Kokubo, H. Takadama, *In vitro* evaluation of bone bioactivity. Chapter 7 in: *Bioceramics and their clinical applications*. Edited by Tadashi Kokubo. Chubu University Japan.
- <sup>13</sup> S. Fujibayashi, M. Neo, H. M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura, “Comparative study between *in vivo* bone ingrowth and *in vitro* apatite formation on Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> glasses”, *Biomaterials*, 24, 1349–1356 (2003).
- <sup>14</sup> H. M. Kim, F. Miyaji, T. Kokubo, C. Ohtsuki, T. Nakamura. “Bioactivity of Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub> glasses’, *J Am Ceram Soc*, 78, 2405–2411 (1995).
- <sup>15</sup> T. Kokubo, T. Himeno, H. M. Kim, M. Kawashita, T. Nakamura, “Process of bonelike apatite formation on sintered hydroxyapatite in serum-containing protein”, *Bioceramics*, Vol. 16, Switzerland: Tran Tech Pub, 139–142 (2003).
- <sup>16</sup> H. Takadama, H. M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura, “Mechanism of biomineralization of apatite on a sodium silicate glass: TEM-EDX study *in vitro*”, *Chem Mater*, 13, 1108–1113 (2001).
- <sup>17</sup> H. Takadama, H. M. Kim, T. Kokubo, T. Nakamura, “X-ray photoelectron spectroscopy study on the process of apatite formation on a sodium silicate glass in simulated body fluid”, *J Am Ceram Soc*, 85, 1933–1936 (2002).
- <sup>18</sup> K. Ioku, H. Toya, H. Fujimori, S. Goto, “*In vitro* reaction for calcium phosphate bioceramics”, *Korean J Ceram*, 6, 214–218(2000),.
- <sup>19</sup> R. Xin, Y. Leng, J. Chen, Q. Zhang, “A comparative study of calcium phosphate formation on bioceramics *in vitro* and *in vivo*”, *Biomaterials*, 26, 6477–6486(2005).
- <sup>20</sup> H. Yasuda, Y. Fujita, W. Fujitani, Y. Umakoshi, Y. Sakka, F. Tang, A. Takaoka, N. Matsuura, “Bone-like layer growth and adhesion of osteoblast-like cells on calcium deficient hydroxyapatite synthesized at different pH”, *Mater Trans*, 45, 1782–1787(2006).
- <sup>21</sup> G. H. Nancollas, J. S. Wefel, “Seeded growth of calcium phosphates: effect of different calcium phosphate seed material”, *J Dent Res*, 55, 617–624(1976).
- <sup>22</sup> L. M. Hirakata, M. Kon, K. Asaoka, “Evaluation of apatite ceramics containing alpha-tricalcium phosphate by immersion in simulated body fluid”, *Biomed Mater Eng*, 13, 247–259 (2003).
- <sup>23</sup> D. Lee, C. Rey, M. Aiolo, A. Tofighi, “Methods and products related to the physical conversion of reactive amorphous calcium phosphate”, *US patent no. 6117456* (2000).
- <sup>24</sup> W. Xue, K. Dahlquist, A. Banerjee, A. Bandyopadhyay, S. Bose. “Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants”. *J Mater Sci: Mater Med* 19:2669–2677 (2008).

- 
- <sup>25</sup> S. Ni, K. Lin, J. Chang, L. Chou. " $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub>/ $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> composite materials for hard tissue repair: In vitro studies. Journal of biomedical materials research. Part A [1549-3296] 85 [1] 72-82 (2008)
- <sup>26</sup> P. Ducheyne, S. Radin, L. King. "The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on *in vitro* behavior. I. Dissolution". Journal of Biomedical Materials Research. 27 [1] 25-34 (1993).
- <sup>27</sup> W. Xue, K. Dahlquist, Banerjee A, Bandyopadhyay A, Bose S. "Synthesis and characterization of tricalcium phosphate with Zn and Mg based dopants". *J Mater Sci: Mater Med* 19:2669-2677(2008)
- <sup>28</sup> S. Ni, K. Lin, J. Chang, L. Chou. " $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub>/ $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> composite materials for hard tissue repair: In vitro studies". *Journal of biomedical materials research. Part A* [1549-3296] 85 [1] 72-82 (2008)
- <sup>29</sup> P. Ducheyne, S. Radin, L. King. "The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on *in vitro* behavior. I. Dissolution". *Journal of Biomedical Materials Research*. 27 [1] 25-34 (1993)
- <sup>30</sup> Outokumpu HSC. Chemistry for Windows, v 5.1. Outokumpu Research on Information Service, Pori.
- <sup>31</sup> J.C. Elliot. "Structure and Chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates" Chapter 18 in "Studies in Inorganic Chemistry" Elsevier, (1994).

**Capítulo 8.**

**ESTUDIOS IN VITRO.**

**EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD  
UTILIZANDO UN CULTIVO PRIMARIO DE  
OSTEOBLASTOS HUMANOS**



El uso de los cultivos celulares con el fin de estudiar la biocompatibilidad de un biomaterial es relativamente reciente y constituye una potente herramienta, que ayuda a inferir resultados previos a los ensayos *in vivo* y de experimentación clínica. En los ensayos con cultivos celulares se busca reproducir artificialmente las condiciones del entorno necesarias para garantizar la viabilidad de las células de un organismo vivo<sup>(1)</sup>.

La experimentación con cultivos celulares en estudios de biocompatibilidad presenta una serie de ventajas, tales como la extremada sensibilidad de los cultivos a los agentes tóxicos, la posibilidad de investigar interacciones a nivel celular o molecular, y la habilidad para realizar series largas de experimentos en las mismas condiciones.

Por otro lado, los ensayos *in vitro* no eliminan la necesidad de realizar ensayos posteriores *in vivo* sobre animales de experimentación, para analizar y detectar procesos negativos de respuesta tisular como la formación de tejido fibroso, inflamación, carcinogénesis, etc. Igualmente, determinados resultados *in vitro* no presuponen idéntica condición en las pruebas *in vivo*, ya que los ensayos *in vitro* son una parte simplificada de los mecanismos complejos que ocurren *in vivo*<sup>(1)</sup>. Por esto se hace necesario el seguimiento y análisis continuo y temporal, incluso durante años, de los resultados *in vitro*, *in vivo* y clínicos.

Los estudios de biocompatibilidad *in vitro* se han constituido en un instrumento básico en el desarrollo de nuevos biomateriales, ya que permiten la valoración de los efectos que estos puedan causar sobre distintos aspectos de la actividad celular. La aplicación de los cultivos celulares en el campo de los biomateriales es bastante reciente, y constituye en este campo una potente herramienta para, con un bajo coste material y temporal, inferir con elevada seguridad el grado de biocompatibilidad de una determinada formulación. Este hecho va a ser de especial relevancia cuando aun no se ha alcanzado el diseño definitivo del material, puesto que va a ser posible evaluar la biocompatibilidad *in vitro* de distintos materiales, abordando los posteriores ensayos *in vivo* y clínicos con mayores posibilidades de éxito.

A pesar de que el empleo de cultivos celulares en el estudio de la biocompatibilidad ha demostrado ser una herramienta importante, su utilización no elimina la necesidad de realizar posteriores estudios *in vivo*, que permitan analizar otra serie de respuestas, entre las que se encuentran la formación de cápsulas fibrosas, procesos de vascularización o inflamación, etc. El hecho de obtener para una determinada

formulación unos resultados que muestren una elevada biocompatibilidad *in vitro*, no garantiza que su comportamiento *in vivo* vaya a ser igualmente bueno. No es correcto relacionar biunívocamente una elevada biocompatibilidad *in vitro* con una buena aceptación tras su implantación en un organismo vivo para un biomaterial específico, ni siquiera va a ser posible extrapolar los resultados obtenidos en un determinado individuo al resto de la población, ya que la respuesta individual frente a un mismo cuerpo extraño varía notablemente en función de una gran diversidad de factores inherentes a la inclusión *in vivo*. Cada nueva implantación, a pesar de que el material implantado haya mostrado una elevada biocompatibilidad en otros casos, debe considerarse como un nuevo experimento, que precisa de un intenso análisis y seguimiento temporal.

En este capítulo se estudiará la biocompatibilidad de los materiales desarrollados mediante ensayos *in vitro* con cultivos celulares de osteoblastos humanos.

### 8.1 Revisión Bibliográfica

Los cultivos celulares se derivan de un cultivo primario o de una línea celular. El primero se refiere a células de tejido que son aisladas y cultivadas *in vitro* sin haber sido subcultivadas. Las células primarias son generalmente heterogéneas, con una fracción baja de células de crecimiento, pero contienen una variedad de tipos de células las cuales son representativas del tejido. El subcultivo permite la propagación de las células, lo que se conoce como línea celular, en general son más uniformes<sup>(1)</sup>.

Las líneas celulares continuas, aisladas originalmente de un neoplasma o transformadas por virus o mutagénesis, están disponibles en compañías o en la colección de tipo de cultivos de América (ATCC) (Maryland, USA). Entre las ventajas de usar estas líneas se tienen: representan una fuente abundante de células homogéneas y, las condiciones de cultivo están cuidadosamente estandarizadas. La principal desventaja es que se pueden contaminar fácilmente por microplasma o PPLO (pleuropneumonia) del serum, tripsina o por el operador, llevando a la degeneración del cultivo. Además, es arbitrario el transferir resultados *in vitro* usando células de un tumor a la situación clínica *in vivo* donde se presentan células normales<sup>(2)</sup>.

Con el fin de minimizar las diferencias existentes entre los ensayos *in vitro* e *in vivo* es deseable el uso de células humanas, dependiendo del uso final del implante existen diferentes células que se pueden usar, como se muestra en la Tabla 8.1.

Las células madre son células multipotenciales sin diferenciar, las cuales residen en varios tejidos humanos y tienen el potencial para diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos y otros tejidos de origen mesenquimal. Su uso depende de la citocompatibilidad específica que se quiera evaluar, la Tabla 8.1 muestra las células a usar dependiendo de lo que se quiera estudiar<sup>(1,3,4)</sup>.

**Tabla 8.1.** Tipo de células usadas dependiendo de la respuesta del biomaterial que se quiera estudiar.

Citocompatibilidad a Estudiar	Tipo de células
Actividad de Inmunomodulación	Linfocitos Macrófagos Granulocitos
Modulación de la coagulación	Endotelial
Actividad de formación de hueso	Osteoblastos
Capacidad citoadhesiva	Corneales

Se utilizan diversos test *in vitro* para determinar la biocompatibilidad, estos están basados en diferentes métodos y principios, como se muestra en la Tabla 8.2<sup>(2)</sup>.

Las variables más relevantes a determinar por este tipo de ensayos son la viabilidad, la proliferación celular, la adhesión o la muerte celular por diferentes mecanismos.

### 8.1.1 Estudio de adhesión y migración celular

La migración celular requiere interacciones dinámicas entre la célula, el sustrato y el citoesqueleto. Primeramente, las células desarrollan una protuberancia de su límite frontal para formar un lamelopodio, las células usan interacciones adhesivas para generar la tracción y las energías requeridas para el movimiento de la célula. Segundo, después de la formación y fijación del lamelopodio, las células usan interacciones adhesivas para generar la tracción y las energías requeridas para el movimiento de las células. El último paso del ciclo de migración es disminuir la adhesión, contraerse y levantarse<sup>(5)</sup>.

### 8.1.2 Estudio de viabilidad y proliferación celular

La viabilidad celular se refiere a la cantidad de células que permanecen vivas y viables en un cultivo, mientras que la proliferación celular supone una medida del crecimiento o división celular que ocurre en un cultivo y precisa la adhesión en líneas adherentes de las células al sustrato (el biomaterial), por esto la proliferación es un factor que va unido al de adhesión.

**Tabla 8.2.** Tipos de ensayos biológicos utilizados en los estudios de biocompatibilidad de biomateriales.

Ensayos	Metodología
Viabilidad y Citotoxicidad	Ensayo de MTT <sup>(6,7,8)</sup> . Tinción de Trypan Blue. Tinción rojo neutro. Tinción de yoduro de propidio. Test de liberación de Cr.
Proliferación y adhesión celular	Ensayo de Alamar Blue <sup>(9,10,11,12)</sup> . Test de síntesis de proteínas. Test de síntesis de DNA. Test de antígenos de proliferación. Microscopía electrónica de barrido (MEB). Microscopía confocal láser.
Biodegradación	Test de biodegradabilidad por microorganismos, soluciones salinas, cultivos de macrófagos.
Mutagénesis-carcinogénesis	Test de Ames. Test del gen HPRT. Test citogenético. Test de micronúcleos. Test de repartición primaria del DNA. Test de inducción de transformación celular.

El término adhesión en biomateriales incluye diferentes fenómenos: la fase de sujeción, la cual ocurre rápidamente e involucra eventos fisicoquímicos entre el material y las células que envuelven fuerzas iónicas, de Van der Waals, etc. Por otro lado está la fase de adhesión la cual involucra varias moléculas biológicas: proteínas



de matriz extracelular, proteínas de a membrana celular y de las proteínas del citoesqueleto, las cuales interactúan juntas para inducir transducción de señal, promoviendo la acción de los factores de transcripción y por consiguiente regulando la expresión genética<sup>(5,13)</sup>.

Los métodos que cuantifican la proliferación celular se basan en determinaciones inmunohistoquímicas, cuantificación de la síntesis de ADN y proteínas mediante marcadores radioactivos, medida de la reducción del medio de cultivo, tinción de células o moléculas por colorantes específicos, etc.

### **8.1.3 Cultivos celulares en C<sub>3</sub>P**

En la bibliografía se pueden encontrar gran cantidad de estudios, de distintos autores, sobre cultivos celulares de osteoblastos, osteoclastos y precursores de células óseas en cerámicas de C<sub>3</sub>P. Estos estudios, a menudo, se han llevado a cabo en muestras poco caracterizadas (tamaño de grano, impurezas, microestructura y rugosidad de la superficie considerada). En ellos se utilizan líneas de células y métodos de cultivo diferentes. Por lo tanto, no es posible correlacionar los conjuntos de datos y vincular las observaciones con parámetros físicoquímicos específicos. Además, se ha publicado que las alteraciones superficiales de las cerámicas de C<sub>3</sub>P en los medios de cultivo celular son capaces de modificar el comportamiento celular en el curso de los experimentos. Un seguimiento de la composición mineral en el medio de cultivo celular y un análisis de la superficie de la cerámica después del cultivo celular, será de gran ayuda para aclarar algunos resultados contradictorios.

Diferentes autores han observado que las cerámicas de C<sub>3</sub>P no son citotóxicas en contacto con el extracto del suero de cultivo. En presencia de polvos de C<sub>3</sub>P, que pueden ser liberados desde polvos de cemento de fosfatos o de erosión de cerámica, el comportamiento de los osteoblastos depende en gran medida de la cantidad y el tamaño de las partículas. La presencia de grandes cantidades de partículas pequeñas afectan el crecimiento celular<sup>(14,15)</sup> y pueden causar la muerte celular, sin embargo, se ha demostrado que pequeñas cantidades de polvos de  $\alpha$ -C<sub>3</sub>P favorecen la proliferación y expresión de osteoblastos posiblemente relacionado con la liberación de iones, especialmente iones calcio y fosfato que actúan directamente sobre las células<sup>(16)</sup>. Algunos informes hablan de muerte celular en contacto con las cerámicas de  $\beta$ -C<sub>3</sub>P<sup>(17,18)</sup> lo que se ha relacionado con la formación de cristales de Ca-P

intramitocondrial, causando lisis mitocondria y la subsiguiente muerte celular<sup>(10)</sup>. Sin embargo, estos hechos ha sido raramente descritos y podrían deberse a la erosión de la superficie de las cerámicas. Los cultivos de células osteoblásticas en muestras compuestas (fosfatos de calcio bifásico, C<sub>3</sub>P y colágeno o polímeros) generalmente dan mejores resultados que en fosfatos monofásicos. También se ha afirmado que los C<sub>3</sub>P con sustitución iónica (cementos de Zn-β-C<sub>3</sub>P, Mg-β-C<sub>3</sub>P y Si-α-C<sub>3</sub>P)<sup>(19)</sup> mejoran la adhesión y la proliferación de osteoblastos, y en ocasiones se ha relacionado con una relación óptima de iones de sustitución<sup>(20)</sup>, en comparación con el C<sub>3</sub>P puro.

El comportamiento de los osteoclastos ha sido estudiado por pocos autores por lo que se han publicado pocos datos sobre el tema. Algunos autores no han observado ninguna actividad en la superficie de α- y β- C<sub>3</sub>P a pesar de las alteraciones en las concentraciones de calcio y de fosfato en el medio de cultivo celular<sup>(21)</sup>. Específicamente, las posibles razones de este fracaso pueden ser la liberación de iones y la probable existencia de una reacción superficial alcalina relacionada con la hidrólisis de la superficie, inhibiendo de actividad de los osteoclastos. En otros casos, sin embargo, se ha descrito la adhesión y la actividad de reabsorción de los osteoclastos, evidenciando una degradación mucho más fuerte del β-C<sub>3</sub>P respecto a HAp<sup>(22,23)</sup>, relacionado con la velocidad de disolución de estos fosfatos de calcio. Estos datos parecen estar de acuerdo con los estudios in vivo. Recientemente, un estudio de la expresión de quimioquinas involucrando cultivos celulares de osteoclastos en diferentes sustratos evidencia una interacción específica de sustratos de Ca-P en comparación con plástico<sup>(24)</sup>.

## 8.2 Desarrollo Experimental

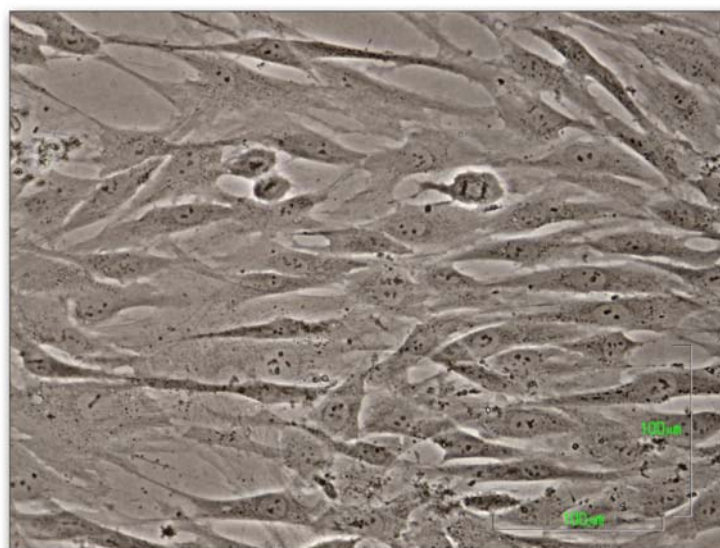
Los materiales incluidos en esta parte de la tesis se han procesado con las mismas composiciones y tratamientos térmicos, y las probetas se obtuvieron siguiendo procesos similares a los utilizados para las probetas de los estudios de bioactividad *in vitro* en SBF y en Tris HCl descritos en el capítulo 7. C40/1250°C, C95/1250°C, C99/1300°C y C100/1300°C.

Se procesaron dos tipos de probetas, discos de 6 mm Ø/2mm de espesor y 13 mm Ø/ 2 mm de espesor. Los discos de 6 mm se obtuvieron de la forma descrita en el capítulo 7. Los discos de 13 mm se prepararon mediante compresión uniaxial a 125 MPa en un troquel de acero de 20 mm de Ø, donde se obtuvieron cilindros de 20 mm

de diámetro por 20 mm de altura que posteriormente se sometieron a prensado isostático a 200 MPa. El ciclo térmico fue el usado para los discos de 6 mm de Ø. Los cilindros así obtenidos se cortaron en forma de discos de 13 mm de diámetro por 2 mm de espesor, la mitad de los discos se dejaron con la superficie de corte y la otra mitad se pulió con discos abrasivos de SiC (número 4000, tamaño de grano  $\approx 8 \mu\text{m}$ ). La rugosidad de las muestras con los dos acabados se midió con un rugosímetro Perthometer M1 (Mahr, Göttingen, Alemania) utilizando los parámetros Ra, Rpm y Rz sobre la superficie de las muestras pulidas y sin pulir.

Ra es la rugosidad media, es decir, la altura media del perfil por encima y por debajo de una línea central. Rz se define como la altura máxima media entre las puntas y las depresiones de cinco longitudes de muestras consecutivas dentro de la longitud de medición, y se usa para describir el grado de rugosidad de la superficie de la muestra. Los valores de Ra y Rz se han medido en micras, sobre una distancia de 5,6 mm.

En el estudio se han utilizado osteoblastos fetales humanos, subcultivo 4 (HOb; Health Protection Agency Culture Collections -HPAC- 406-05f) (Figura 8.1). Este cultivo primario se ha escogido teniendo en cuenta las aplicaciones esperadas de los materiales de estudio. Como control negativo se usaron discos de Thermanox® (TMX, NUNC) de 6 y 13 mm de diámetro. En el ensayo MTT se ha utilizado una disolución de Triton X-100 (Merck) al 0,5% en medio de cultivo como control positivo.



**Figura 8.1.** Osteoblastos humanos en cultivo (subcultivo 4) transcurridas 48 h desde su siembra, bajo microscopio invertido de contraste de fases (Nikon ECLIPSE TS100; 200X).

El mantenimiento de la línea celular se llevó a cabo realizando los pases antes de alcanzar el 80-90% de la confluencia, transcurrido un periodo de entre 4 y 5 días después de realizar la siembra, utilizando una disolución de tripsina (0,5 g/l) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA; 0,2 g/l) en una solución salina balanceada de Hank, para liberar las uniones intercelulares y las de las células con la superficie de cultivo. Los medios de cultivos y otros reactivos usados están relacionados en el capítulo 3.

Los ensayos realizados pretenden cuantificar la citotoxicidad liberada al medio por parte de los materiales estudiados, y estudiar la proliferación, adhesión y muerte celular en cultivos establecidos directamente sobre la superficie de las muestras.

Con el objetivo de analizar la liberación de productos tóxicos desde cada uno de los materiales se ha realizado un **ensayo MTT**, utilizando el cultivo primario de osteoblastos humanos. En este estudio se usaron las muestras sin pulir de 13 mm de diámetro a 37°C. Los detalles del protocolo utilizado se presentan en el capítulo 3.

Los valores de la viabilidad celular relativa se obtienen con respecto al control, a partir de la siguiente fórmula:

$$\%VR = \frac{DO_S - DO_B}{DO_C - DO_B} \times 100$$

donde,  $DO_S$ ,  $DO_B$  y  $DO_C$  son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (medio de cultivo introducido en pocillos sin células) y el control, respectivamente.

El ensayo **Alamar Blue** se realizó con el objetivo de estudiar la evolución temporal de la proliferación celular, durante un periodo de 21 días, en cultivos establecidos directamente sobre la superficie de los materiales. Este ensayo permite realizar diferentes medidas de actividad celular a lo largo de un periodo debido a que el reactivo utilizado no resulta tóxico para las células cultivadas en contacto con el mismo. La actividad celular tiene como resultado la reducción del reactivo adicionado que vira de color, hecho que puede medirse colorimétricamente.

El estudio se realizó sobre muestras, pulidas (C100p, C99p, C95p y C40p) y sin pulir (C95 y C99), de 6 mm de diámetro previamente esterilizadas y los tiempos de cultivo variaron entre 3, 8, 15 y 21 días, con el fin de obtener el patrón que modeliza la

proliferación de osteoblastos sobre la superficie de TMX y las formulaciones experimentales durante los 21 días que ha durado el ensayo. Los detalles del protocolo utilizado se presentan en el capítulo 3.

Para completar este estudio, se ha sembrado un concentrado de células en medio completo, con una concentración de  $14 \cdot 10^4$  células/ml, directamente sobre la superficie de las muestras, pulidas (C100p, C99p, C95p y C40p) y sin pulir (C95 y C99), esterilizadas de 13 mm de diámetro y del control negativo TMX, en todos los casos por duplicado, en placas de cultivo de 24 pocillos. Tras mantener estas muestras durante 24 y 72 h en incubación a 37 °C en una atmósfera con un 5 % de CO<sub>2</sub>, se procedió a fijar las muestras, se metalizaron con oro y se observaron en **MEB**. La siembra de las células, la incubación y el tratamiento de las probetas se realizó mediante el protocolo que se explica con detalle en el capítulo 3.

### **8.3 Resultados**

Los resultados de la caracterización física incluyendo los datos de porosidad y rugosidad de las muestras se presenta en la Tabla 8.3.

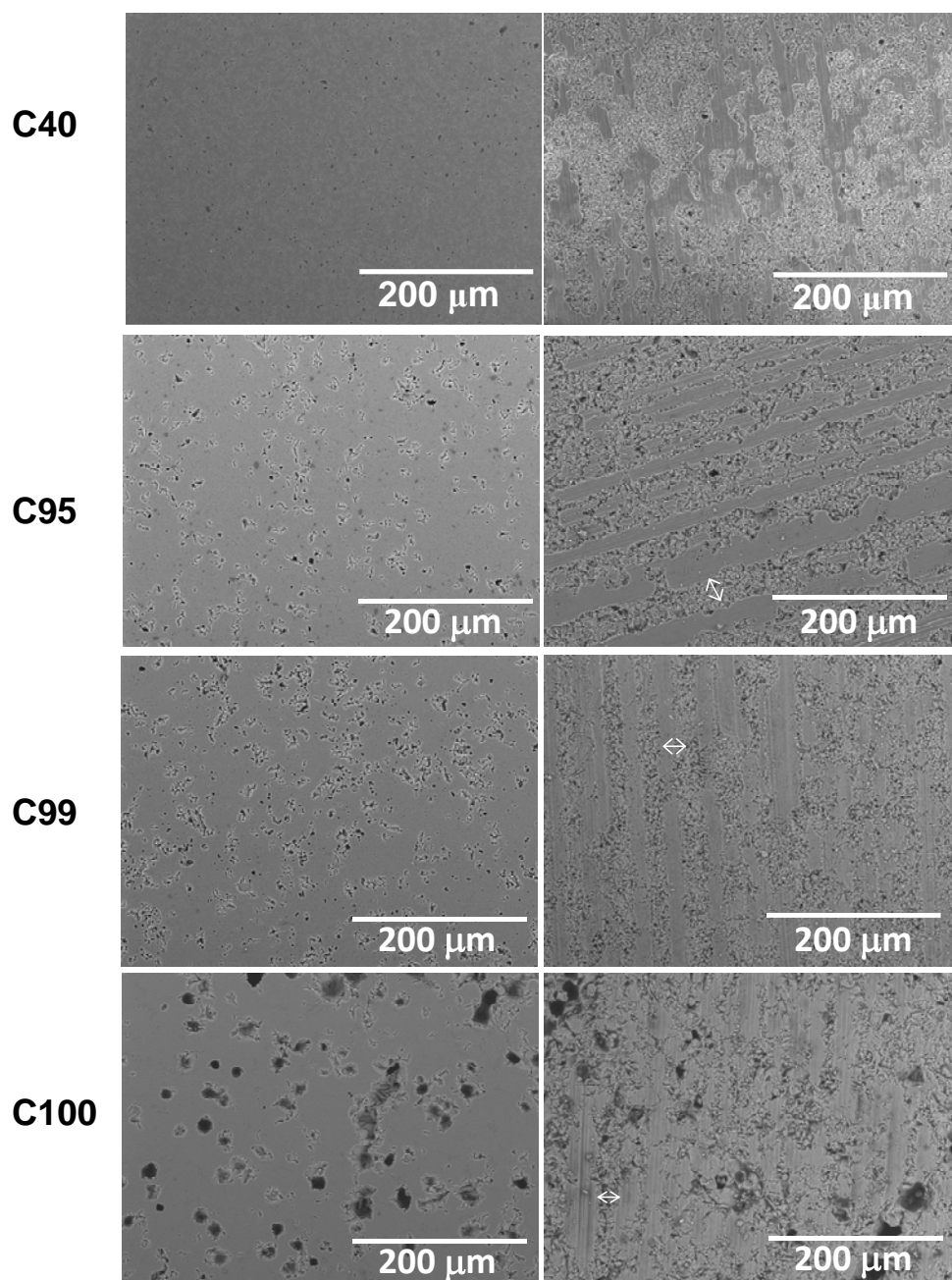
El cambio en la rugosidad debida al pulido con la lija 4000 ( $<8 \mu\text{m}$ ) no es igual en todos los casos: para C40, C95 y C99 el Ra disminuye entre 6 y 7 veces y el Rz entre 2 y 3 veces, mientras que para C100 el Ra y el Rz disminuye apenas entre un 30% y 40%. Este comportamiento puede deberse principalmente a la alta porosidad y gran tamaño de poro de la muestra C100, ver Figura 8.2, que altera de forma considerable la medida de la rugosidad de la muestra pulida.

El aspecto superficial de las muestras antes de someterse a los experimentos de cultivos celulares se presenta en la Figura 8.2. Se aprecia como en las muestras sin pulir, se observan zonas donde predominan sendas de corte paralelas con una distancia entre ellas de  $\approx 40 \mu\text{m}$  y zonas entre ellas donde se han producido arranques y se observan las superficies de fractura de los granos. En las muestras pulidas se observa con claridad la alta porosidad y gran tamaño de poro ( $\approx 20 \mu\text{m} \varnothing$  y hasta  $100 \mu\text{m}$  de longitud) de la muestra C100 que afecta la medida de rugosidad como se dijo anteriormente.

**Tabla 8.3** Datos de la rugosidad superficial de las probetas utilizadas en el estudio de cultivos celulares.

Muestra Com/T(°C)	Densidad <sup>‡</sup> ±0,02 (g/cm <sup>3</sup> )	Porosidad* (%)	Rugosidad (μm) <sup>***</sup>		Fases por DRX y MEB-EDS			
			Pulida	Sin pulir	α-C <sub>3</sub> P	β-C <sub>3</sub> P	CMS <sub>2</sub>	Ap
C40/1250	3,10	2	Ra: 0,076±0,012 Rz: 1,47±0,47	Ra: 0,55±0,09 Rz: 3,37±0,41	-	++	++	tr
C95/1250	2,94	5	Ra: 0,13±0,02 Rz: 1,93±0,22	Ra: 0,78±0,13 Rz: 4,93±0,80	-	++	-	tr
C99/1300	2,80	8	Ra 0,18±0,10 Rz: 2,15±0,54	Ra: 1,03±0,12 Rz: 6,83±0,78	++	+++	-	-
C100/1300	2,59	11	Ra: 2,22±0,72 Rz: 18,5±4,0	Ra: 3,62±1,73 Rz: 26,4±10,0	+++	+	-	-

\*El valor de la porosidad se ha estimado teniendo en cuenta los valores de la densidad aparente y de la densidad teórica de cada una de las fases. <sup>‡</sup> La densidad aparente se ha determinado por desplazamiento en agua. \* Los valores de rugosidad fueron medidos en las pastillas de 13 mm, sobre una longitud de 5,6 mm.



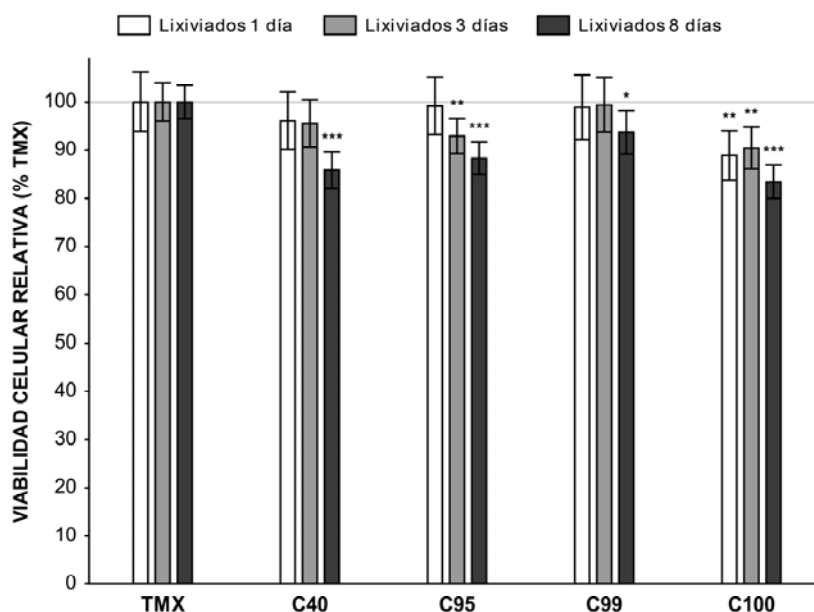
**Figura 8.2.** Micrografías de MEB que muestran el aspecto superficial de las muestras.

### 8.3.1 Ensayo MTT. Cuantificación de la citotoxicidad *In Vitro*.

Los resultados obtenidos en el ensayo MTT se presentan en la Figura 8.3. En ningún caso los lixiviados de los materiales a los diferentes tiempos analizados dan lugar a un descenso notable en la viabilidad de los osteoblastos cultivados.

Aunque en algunos casos se han obtenido diferencias significativas con respecto al control negativo, los valores medios de la viabilidad celular en ningún caso descienden

por debajo del 80%, y por tanto, se puede decir que ninguno de los materiales objeto de estudio libera componentes citotóxicos al medio.



**Figura 8.3.** Resultados del ensayo MTT para los cultivos de osteoblastos humanos mantenidos con los lixiviados de 1, 3 y 8 días obtenidos a partir de muestras del control TMX y las formulaciones C40, C95, C99 y C100. Se representa el valor medio de la viabilidad celular relativa  $\pm$  intervalo de confianza al 95% ( $n=12$ ) y el nivel de significación obtenido en el análisis de la varianza efectuado frente a los valores obtenidos para TMX (\*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$ ).

El material puro (C100) fue el único que tuvo valores significativamente inferiores para los 3 tiempos respecto al control negativo. Además, en todos los materiales se observa un leve descenso de la viabilidad celular a los 8 días frente al control negativo. Los materiales con adición de dopantes tuvieron un mejor comportamiento respecto al material puro (C100), y en general, el material con mejor comportamiento fue el C99 con valores casi idénticos al control negativo para los días 1 y 3.

### 8.3.2 Ensayo *Alamar blue*<sup>TM</sup>. Análisis de la adhesión y proliferación celular sobre la superficie de los materiales utilizando cultivos de osteoblastos humanos.

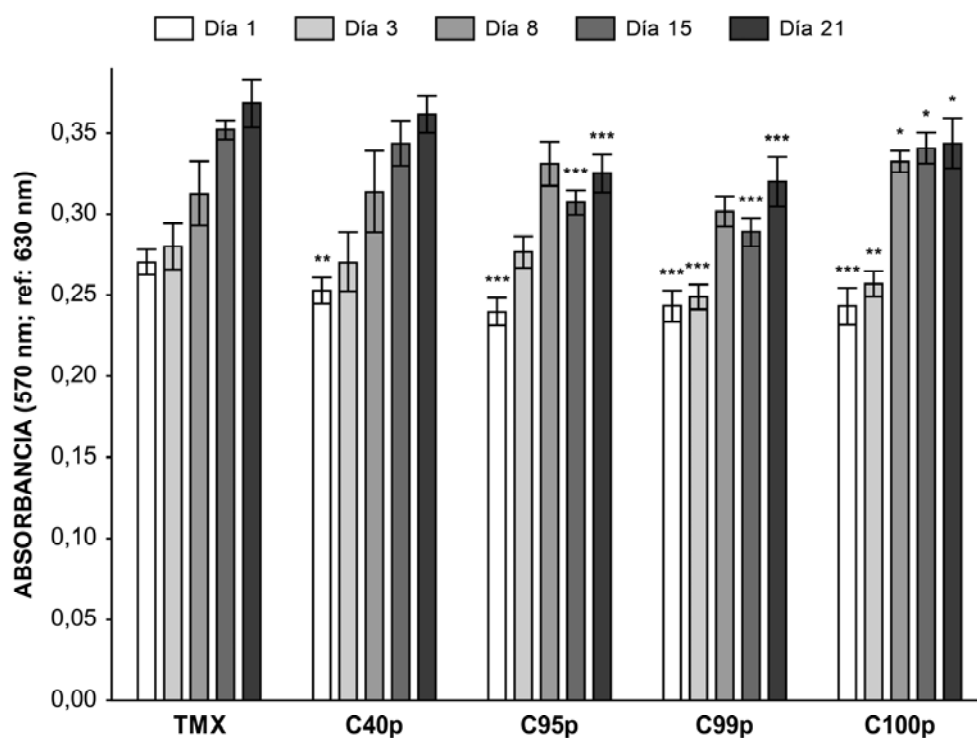
Los resultados obtenidos en el ensayo *Alamar Blue*<sup>TM</sup> para todas las formulaciones estudiadas sobre muestras pulidas se presentan en la Figura 8.4. Se puede observar



que los cultivos sembrados sobre la superficie de las muestras exhiben niveles de actividad celular elevados, cercanos a los medidos para los cultivos sembrados sobre el control negativo, a lo largo del periodo evaluado de 21 días. No se observan grandes diferencias en la evolución y en los valores absolutos de actividad celular.

La dinámica de los cultivos sembrados sobre C40p es similar a la de TMX. Los valores de actividad celular medidos en los cultivos mantenidos sobre las muestras de C40p no difieren significativamente a los medidos para el control TMX, salvo en las primeras 24 horas de cultivo.

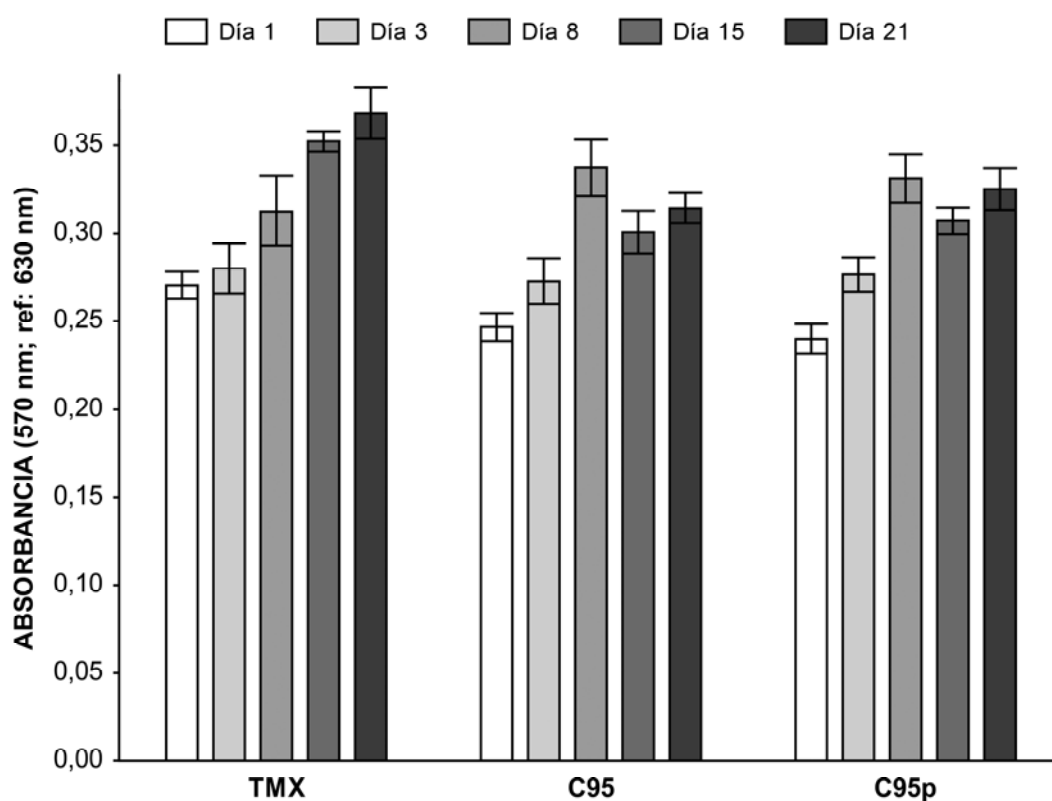
Se aprecia también que la velocidad a la que proliferan los osteoblastos en los cultivos establecidos sobre la superficie de las muestras de la formulación C95p a los 8 días de cultivo es superior tanto a la del resto de las muestras experimentales como a la de los cultivos control.



**Figura 8.4.** Resultados del ensayo *Alamar Blue*<sup>TM</sup> para los cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre el control TMX y las formulaciones pulidas (C40p, C95p, C99p y C100p). Se representa la media  $\pm$  intervalo de confianza al 95% (n=9) y el nivel de significación obtenido en el análisis de la varianza efectuado frente a los valores obtenidos para TMX (\*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001).

Las muestras C100p presentan una tendencia en la proliferación celular y unos valores de actividad celular significativamente inferiores a los obtenidos para el control TMX hasta los 3 días, sin embargo después de ese tiempo se observa un mejor comportamiento de la proliferación y la actividad celular por el resto del periodo de estudio, logrando valores medios a los 8 días incluso mayores a las muestras de TMX.

Con el fin de revisar el efecto del acabado superficial sobre la actividad celular se realizó este ensayo sobre las muestras C95 y C99 con las superficies sin pulir y se compararon los resultados con los obtenidos en las muestras pulidas de las mismas composiciones. Los resultados se muestran en las Figuras 8.5 y 8.6.



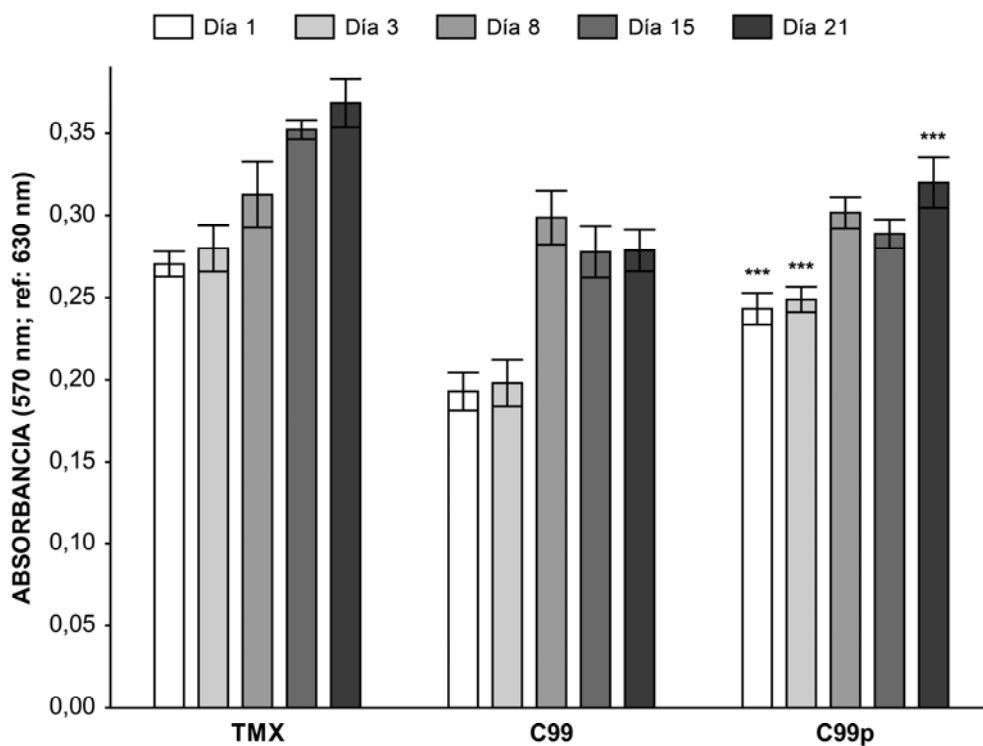
**Figura 8.5.** Resultados del ensayo *Alamar Blue*<sup>TM</sup> para los cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre el control TMX y las formulaciones C95 y C95p. Se representa la media  $\pm$  intervalo de confianza al 95% (n=9).

Los cultivos sembrados sobre las muestras de C95 y C95p no difieren significativamente. En ambos casos el máximo de actividad celular se alcanza tras 8 días de cultivo, siendo en este punto el valor de actividad, medido para estos sistemas,

superior al medido para los cultivos sembrados sobre TMX. Posteriormente los niveles de actividad celular decaen ligeramente.

En el caso de los cultivos sembrados sobre muestras de C99, se observa una apreciable diferencia entre la evolución de la actividad celular de la muestra pulida, C99p, respecto a la muestra sin pulir, C99. Esta actividad fue mayor a todos los tiempos con excepción de los 8 días.

La diferencia en el comportamiento de C99 y C99p puede deberse más que al cambio en el acabado superficial, puesto que no se presentó en la muestra C95, a una posible degradabilidad de la muestra C99, como se evidenció en el capítulo 7, que puede desprender partículas durante el estudio, las cuales tienen un efecto negativo sobre la actividad celular, al pulir la muestra pudo haberse eliminado gran parte de las partículas sueltas.



**Figura 8.6.** Resultados del ensayo *Alamar Blue*<sup>TM</sup> para los cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre el control TMX y las formulaciones C99 y C99p. Se representa la media  $\pm$  intervalo de confianza al 95% (n=9) y el nivel de significación obtenido en el análisis de la varianza efectuado comparando los valores obtenidos para las muestras de C99 frente a los valores obtenidos para C99p (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

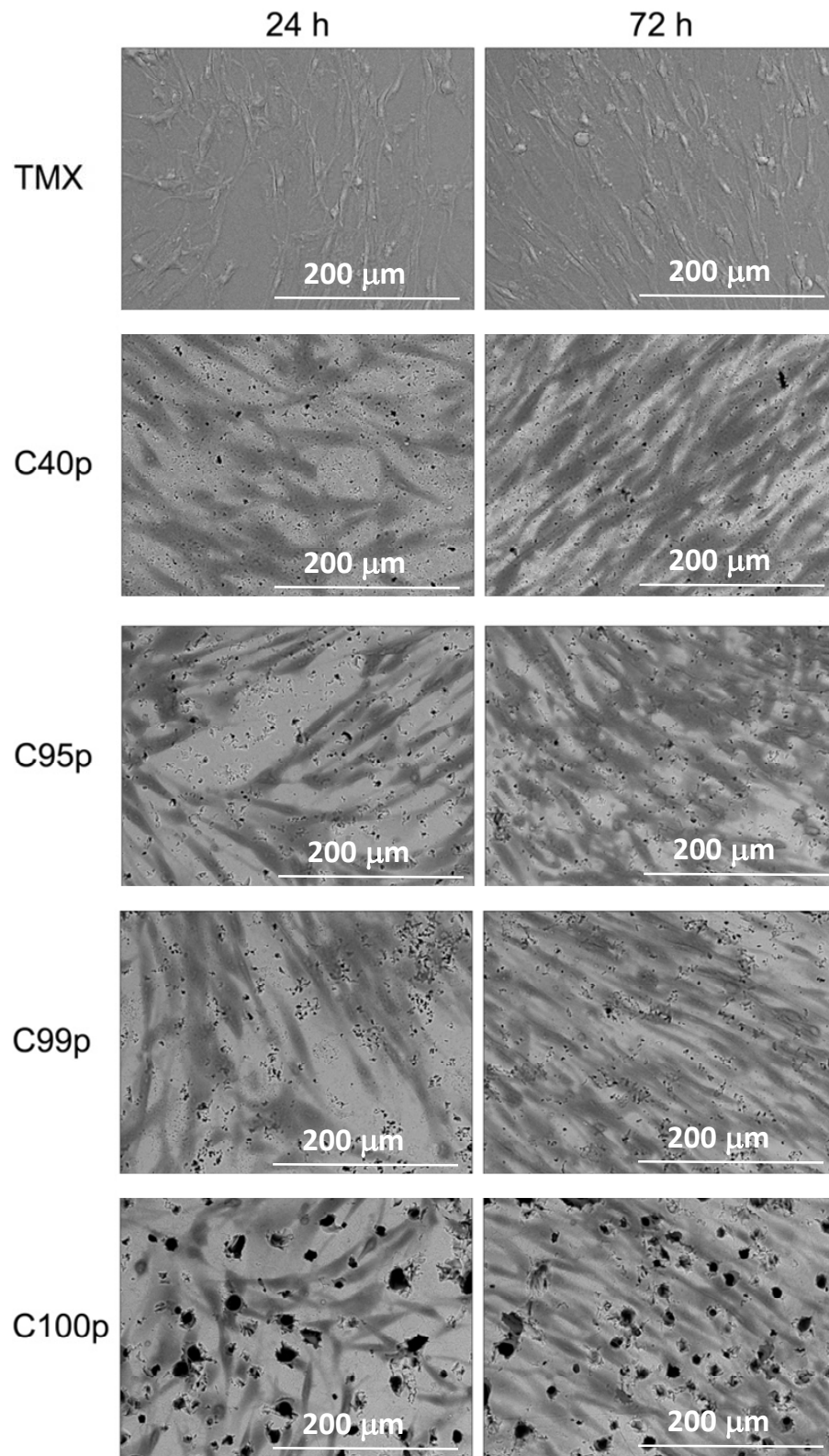
### 8.3.3 Morfología y proliferación celular bajo microscopía electrónica de barrido (MEB)

Como se puede apreciar en la serie de micrográficas de la Figura 8.7, los cultivos de osteoblastos sembrados sobre la superficie de todas las formulaciones y el control TMX presentan células adheridas tras 24 h de cultivo; se observa además un aumento a las 72 h, siendo más notorio este aumento en algunos casos. Las observaciones realizadas bajo microscopía electrónica de barrido se correlacionan perfectamente con los resultados obtenidos en el ensayo *Alamar Blue*<sup>TM</sup>.

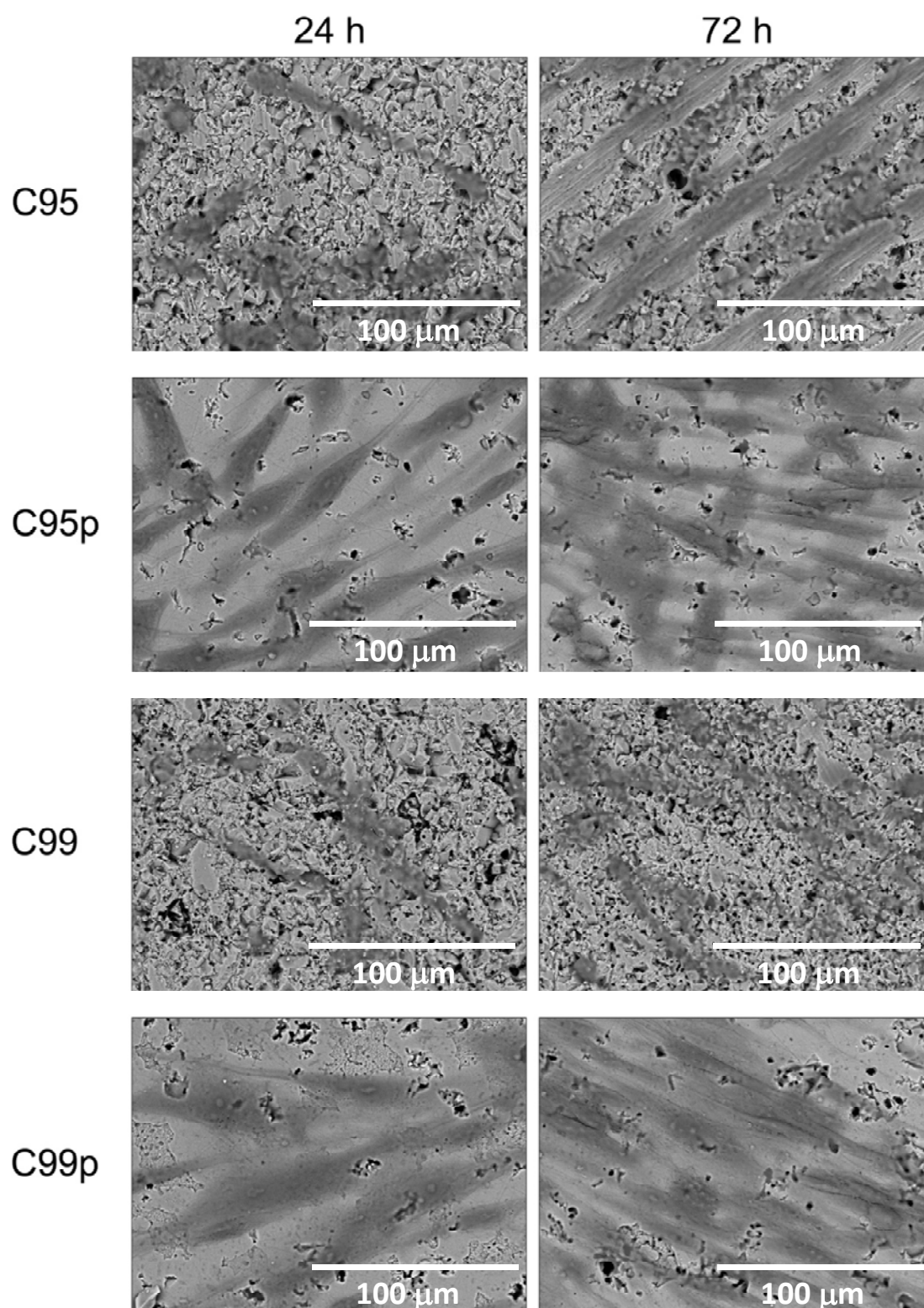
Al igual que en el estudio de Alamar Blue, se estudiaron las muestras C95 y C99 sin pulir para visualizar el efecto del acabado superficial sobre los resultados.

La comparación de las micrográficas de la Figura 8.8 muestra que en el caso de C95 para los dos acabados superficiales se puede apreciar, sobre la superficie de ambas muestras, células perfectamente adheridas tras 24 h y 72 h de cultivo. En ambos casos la densidad de células es superior tras 72 h.

Comparando los cultivos establecidos sobre las muestras no pulidas y pulidas de la formulación C99, a pesar de que en ambos casos aparecen células, destaca la menor densidad de osteoblastos adheridos sobre las muestras sin pulir tanto transcurridas 24 como 72 h desde la siembra (Figura 8.10), estos resultados están en total acuerdo con los resultados del Alamar Blue.

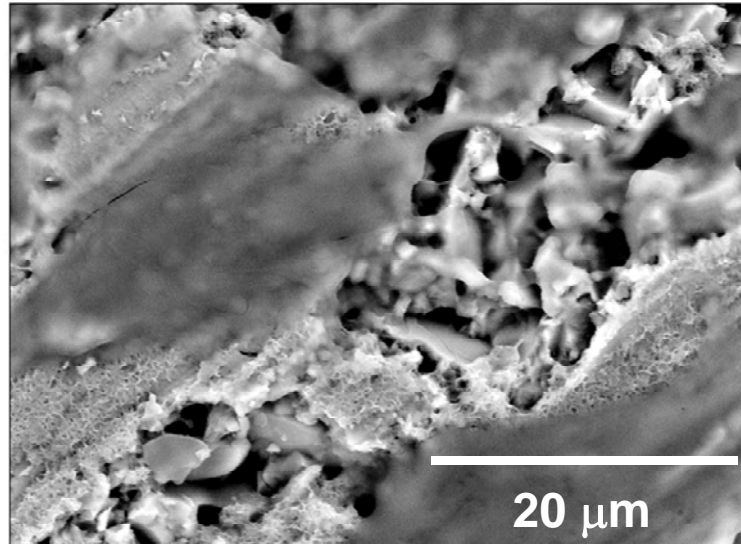


**Figura 8.7.** Cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre la superficie de las muestras pulidas y el control TMX y mantenidos en cultivo durante 24 y 72 h (microscopía electrónica de barrido, 500X). En todas las muestras se observa una buena adherencia de las células al material cerámico.

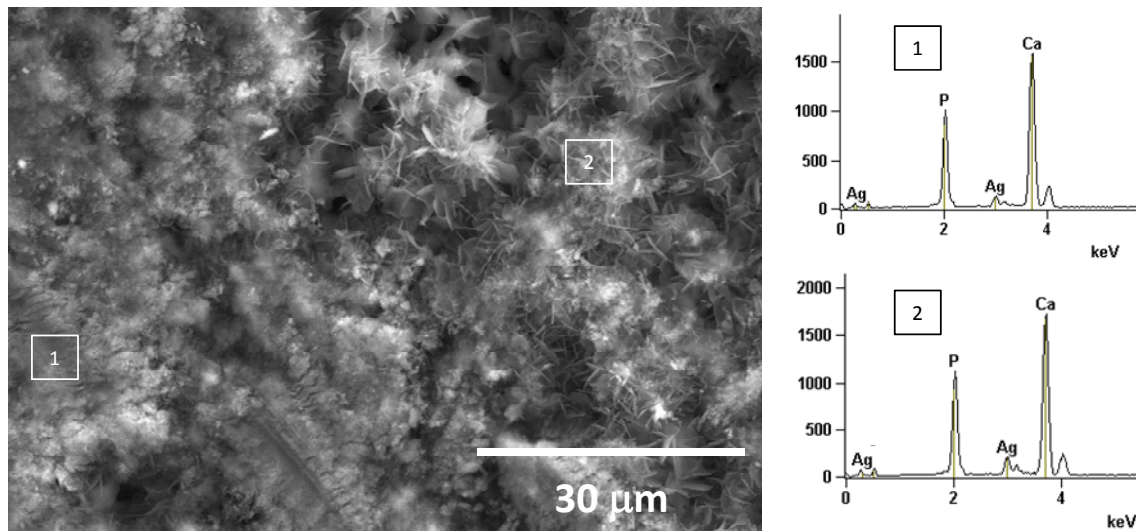


**Figura 8.8.** Cultivos de osteoblastos humanos sembrados sobre la superficie de las formulaciones C95 y C95p y C99 y C99p, y mantenidos en cultivo durante 24 y 72 h (microscopía electrónica de barrido, 1000X).

Una observación a mayores aumentos de las muestras sin pulir de las composiciones C95, Figura 8.8, y C99, Figura 8.9, revelan la presencia de una capa irregular que se ha formado sobre las sendas de corte sobre las que se observan células adheridas.



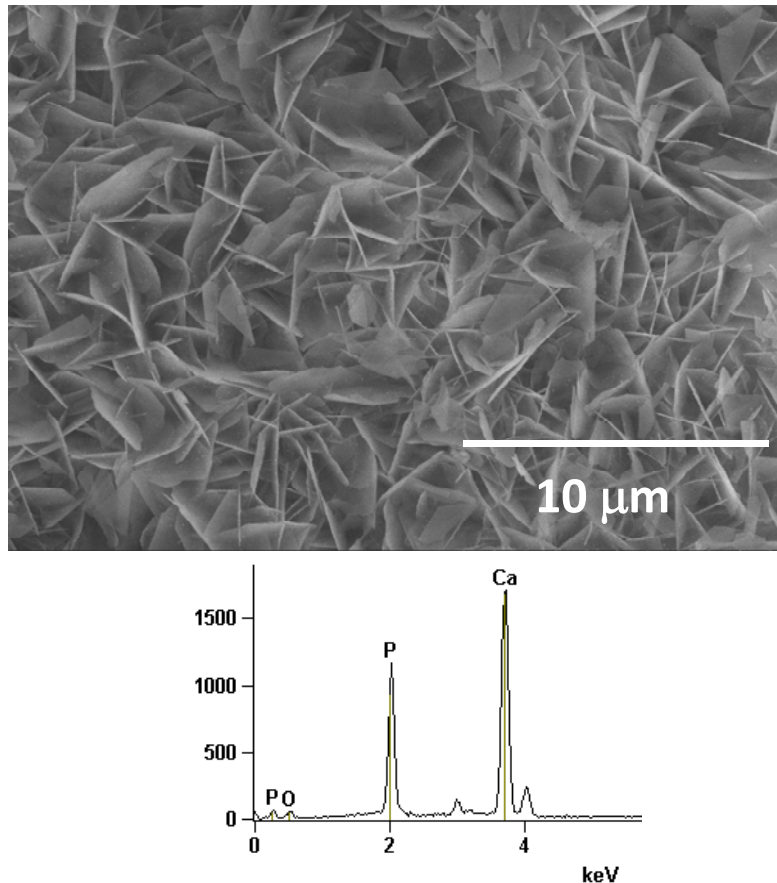
**Figura 8.9.** MEB de Cultivo de osteoblastos humanos sembrado sobre la superficie de la composición C95, y mantenido en cultivo durante 72 h, Se observa la formación de una fase de tipo apatítico



**Figura 8.10.** MEB de cultivo de osteoblastos humanos sembrado sobre la superficie de las formulación C99, y mantenido en cultivo durante 72 h. Se presentan los EDE de dos zonas diferentes de la muestra.

Los EDE de la muestra C99 en dos zonas con características diferentes presentan la misma relación Ca/P.

La observación de la muestra C99 sin pulir por la cara no expuesta a las células presenta una capa homogéneamente distribuida por toda la superficie. Tal como se aprecia en la Figura 8.11.



**Figura 8.11** MEB de la muestra C99 de la cara posterior a la expuesta al cultivo de osteoblastos humanos durante 72 horas. Se ha formado una capa homogénea de una fase tipo apatita. Se presenta EDE.

#### 8.4 Discusión

A la luz de los resultados obtenidos en las distintas pruebas realizadas se puede decir que todos los materiales estudiados son biocompatibles.

En primer lugar el ensayo MTT permitió determinar que ninguno de los materiales incluidos en este estudio libera iones citotóxicos al medio. La viabilidad celular parece estar favorecida por la liberación de iones Mg y Si al medio, puesto que los materiales con adición de estos elementos presentaron mejor comportamiento que el fosfato



tricálcico puro (C100). Como se ha discutido en el capítulo 7, los materiales estudiados liberan iones Si y Mg, que pueden ser los causantes de la mayor viabilidad celular.

Los resultados obtenidos en el ensayo Alamar Blue indican que los materiales estudiados presentan una elevada biocompatibilidad y una superficie adecuada para la adhesión y crecimiento de este tipo de células. El patrón exhibido por cada uno de los materiales presenta un incremento en el número de células a lo largo del estudio, similar al mostrado por el TMX. En concordancia con los resultados de MTT, los materiales con Si y Mg presentaron mejores resultados que el fosfato tricálcico puro hasta el día 8, sin embargo, este comportamiento se invierte para los días 14 y 21.

Los estudios de proliferación celular mediante observación en el MEB, han mostrado unos resultados coincidentes con los obtenidos en el ensayo Alamar Blue. La totalidad de las muestras observadas mediante microscopia óptica presentó unos niveles de proliferación celular cercanos a los exhibidos por el control TMX, presentando las células que componen estos cultivos la misma morfología que las observadas en las preparaciones control.

El acabado superficial de las muestras tuvo un efecto importante sobre el comportamiento celular de las muestras de la composición C99, no así sobre la composición C95. Este diferente comportamiento nos lleva a considerar que el efecto positivo al pulir las muestras C99 no se deba a que haya una mejor adhesión de las células, sino que disminuyó la degradación superficial de la muestra evitando así la liberación de partículas (polvo) que pueden tener un efecto perjudicial sobre las células.

En definitiva, los resultados obtenidos permiten concluir que los materiales estudiados tienen una buena biocompatibilidad independientemente de su microestructura, el tipo o contenido de las fases presentes ( $\beta$ -C<sub>3</sub>P,  $\alpha$ + $\beta$ -C<sub>3</sub>P,  $\beta$ -C<sub>3</sub>P+CMS<sub>2</sub>), por lo que se puede esperar que factores tales como: el contenido de CMS<sub>2</sub> (5-40% en peso) o la temperatura de sinterización (1250°-1400°C) de los materiales en el sistema Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>-CaMg(SiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> no influyan significativamente en su biocompatibilidad. Esto, permite una mayor atención al estudio de otros aspectos, tales como son las propiedades mecánicas y fisicoquímicas que también han sido objeto de estudio en esta tesis, para su posible desarrollo y aplicabilidad.

## 8.5 Conclusiones

Los resultados obtenidos de la viabilidad, proliferación y crecimiento de osteoblastos humanos sobre los materiales estudiados han demostrado que no son citotóxicos, se ha observado una buena adhesión y proliferación celular por lo que todos ellos pueden ser considerados biocompatibles.

Las células se adhieren y crecen sobre la superficie de los materiales de  $C_3P$  y  $C_3P-CMS_2$  y son capaces de producir cristales de fosfatos de calcio de tipo apatítico útiles para la regeneración ósea

Por otro lado, se ha observado que el silicio y el magnesio son elementos importantes en la formulación de un osteoimplante, ya que estimulan la actividad de las células.

## Referencias:

- <sup>1</sup> A. Pizzoferrato, G. Ciapetti, S. Stea, E. Cenni, C. R. Arciola, D. Granchi, and L. Savarino, "Cell cultures methods for testing biocompatibility," *Clinical Materials*, vol. 15, 173-190 (1994).
- <sup>2</sup> R. I. Freshney, *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 4 ed. New York: Wiley-Liss (2000).
- <sup>3</sup> A. Pizzoferrato, A. Vespucci, G. Ciapetti, and S. Stea, "Biocompatibility Testing of Prosthetic Implant Materials by Cell-Cultures," *Biomaterials*, 6 [5] 346-351 (1985).
- <sup>4</sup> I. Pountos, D. Corscadden, P. Emery, and P. V. Giannoudis, "Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application," *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, 38 S23-S33 (2007).
- <sup>5</sup> K. Anselme, "Osteoblast adhesion on biomaterials," *Biomaterials*, 21 [7] 667-681 (2000).
- <sup>6</sup> Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth* 89 271-277 (1986).
- <sup>7</sup> H. Wan, R. Williams, P. Doherty, D.F. Williams. A study of the reproducibility of the MTT test. *J Mater Sci: Mater Med* 5 [3] 154-159 (1994).
- <sup>8</sup> Y. Liu, D. A. Peterson, H. Kimura, D. Shubert. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69 581-593 (1997).
- <sup>9</sup> G. R. Nakayama, M. C. Caton, M. P. Nova, Z. Parandoosh. "Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability *in vitro*". *J Immunol Methods* 204 205-208 (1997).
- <sup>10</sup> M. M. Nociari, A. Shalev, P. Benias, C. Russo. "A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity". *J Immunol Methods* 213 157-167 (1998).
- <sup>11</sup> J. E. Springer, R. D. Azbill, S. L. Carlson. "A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue". *Brain Res Brain Res Protocols* 2 [4] 259-263 (1998).
- <sup>12</sup> H. Gloeckner, T. Jonuleit, H. D. Lemke. "Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue". *J Immunol Methods* 252 131-138 (2001).
- <sup>13</sup> K. Anselme, M. Bigerelle, "Modelling approach in cell/material interactions studies,"

---

*Biomaterials* 27 [8] 1187-1199 (2006).

<sup>14</sup> J. S. Sun, Y. H. Tsuang, C. J. Liao, H. C. Liu, Y. S. Hang, F. H. Lin, "The effects of calcium phosphate particles on the growth of osteoblasts", *J Biomed Mater Res*, 37 324–334 (1997).

<sup>15</sup> D. P. Pioletti, H. Takei, T. Lin, P. Van Landuyt, Q. J. Ma, S. Y. Kwon, K-I. P. Sung, "The effect of calcium phosphate cement particles on osteoblast functions", *Biomaterials* 21 1103–1114 (2000).

<sup>16</sup> A. Ehara, K. Ogata, S. Imazato, S. Ebisu, T. Nakano, Y. Umakoshi, "Effects of  $\alpha$ -TCP and TetCP on MC3T3-E1 proliferation, differentiation and mineralization", *Biomaterials* 24 831–836 (2003).

<sup>17</sup> J. M. Rice, J. A. Hunt, J. A. Gallagher, "Quantitative evaluation of the biocompatible and osteogenic properties of a range of biphasic calcium phosphate granules using primary cultures of human osteoblasts and monocytes", *Calcif Tissue Int*, 72 726–736 (2003).

<sup>18</sup> A. John, H. K. Varma, T. V. Kumari, "Surface reactivity of calcium phosphate based ceramics in cell culture systems", *J Biomater Appl*, 18 63–68 (2003).

<sup>19</sup> C. L. Camire, S. J. Saint-Jean, C. Mochales, P. Nevsten, J-S. Wang, L. Lidgren, I. McCarty, M-P. Ginebra, "Material characterization and in vivo behavior of silicon substituted  $\alpha$ -tricalcium phosphate cement", *J Biomed Mater Res B*, 76B 424–431 (2006).

<sup>20</sup> A. Ito, K. Ojima, H. Naito, N. Ichinose, T. Tateishi, "Preparation, solubility and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphates ceramics", *J Biomed Mater Res*, 50 178–183 (2000).

<sup>21</sup> Y. Doi, H. Iwanaga, T. Shibutani, Y. Moriwaki, Y. Iwayama, "Osteoclastic response to various calcium phosphates in cell culture", *J Biomed Mater Res* 47, 424–433 (1999).

<sup>22</sup> J. D. De Bruijn, Y. P. Bovell, C. A. Van Blitterswijk, "Osteoblast and osteoclast responses to calcium phosphates", *Bioceramics* 7, Pergamon/Elsevier, Oxford, UK, 293–298 (1994).

<sup>23</sup> F. Monchau, A. Lefèvre, M. Descamp, A. Blequin-Myrdycz, P. Laffargue, H. F. Hildebrand, "*In vitro* studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate, calcium carbonate" *Biomol Eng* 19 143–52 (2002).

<sup>24</sup> F. Grassi, A. Piacentini, S. Cristino, S. Toneguzzi, C. Cavallo, A. Facchini, G. Lisignoli, "Human osteoclast express different CXC chemokines depending on cell culture substrate: molecular and immunocytochemical evidence of high levels of CXCL 10 and CXCL 12", *Histochem Cell Biol* 120, 391–400 (2003).

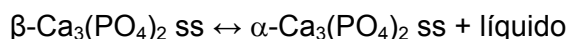
## **CONCLUSIONES GENERALES**



En los capítulos precedentes se han discutido los resultados obtenidos en el presente trabajo, en este apartado se presentan los aspectos sobresalientes que permiten alcanzar los objetivos parciales establecidos en el capítulo 2. *Hipótesis y propósito del trabajo*. Así:

1. Se ha estudiado experimentalmente el sistema fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) - dióxido ( $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ ). Las conclusiones de esta etapa son:

- Se ha confirmado que el sistema puede ser considerado binario, con un eutéctico a  $1300 \pm 5^\circ\text{C}$  y un peritético a  $1440 \pm 10^\circ\text{C}$
- La temperatura de la transformación polimórfica de la fase  $\beta \rightarrow \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  cambia con la cantidad de Mg y Si en solución sólida en el  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  y es máxima para la composición peritética (92 %, en peso de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - 8% en peso de  $\text{CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ ).



- Se han establecido, dos regiones bifásicas, donde coexisten las soluciones sólidas de  $\alpha$ - y  $\beta$ - y  $\alpha$ - y  $\alpha'$ - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

2. Se han sintetizado polvos de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  estequiométricos y con Mg y Si en solución sólida por: solución precipitación y mediante activación por molienda de alta energía. En los dos casos es necesario hacer tratamientos térmicos a temperaturas superiores a  $800^\circ\text{C}$  para obtener materiales cristalinos.

- Por el método de solución-precipitación se han obtenido polvos de hidroxiapatita, fosfato tricálcico apatítico,  $\beta$ - y  $\alpha$ - fosfato tricálcico, todos ellos estequiométricos y con elevada pureza.
- Mediante la molienda de atrición de alta energía se han obtenido polvos altamente reactivos que por tratamiento térmico a  $T > 1250^\circ\text{C}$  dan lugar a  $\beta$ ,  $\alpha$  o  $\alpha + \beta$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  estequiométricos, puros y con Si y Mg en solución sólida.
- Por análisis químico, DRX y espectroscopias Raman y RMN se ha confirmado la estequiometría y pureza de los fosfatos obtenidos. Por RMN de  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$  se ha establecido que el Si entra en solución sólida en la red cristalina del fosfato tricálcico sustituyendo al P y el Mg al Ca.

3. Se han preparado materiales cerámicos de  $\alpha+\beta$ ,  $\beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  con Mg y Si en solución sólida y de  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{ss-CaMg}(\text{SiO}_3)_2$  con microestructuras controladas y propiedades mecánicas optimizadas.

- Se ha establecido el procesamiento para obtener estos materiales con densidades y propiedades mecánicas óptimas (composición, temperatura de sinterización y velocidades de calentamiento y enfriamiento). Se ha comprobado que las adiciones de Mg y Si dan lugar a la formación de líquidos transitorios a  $\approx 1277^\circ\text{C}$  que favorecen el proceso de sinterización y mejoran la densificación de los compactos.

- Las propiedades mecánicas de los materiales obtenidos resistencia a la flexión en tres puntos  $\approx 40$  MPa y módulo de elasticidad  $\approx 60$  GPa son mejores a los de los materiales de fosfatos tricálcicos comerciales. Las diferencias entre los distintos materiales se explican teniendo en cuenta su microestructura (tamaño de grano y de poro, porosidad, microgrietas, composición mineralógica).

4. Se ha estudiado el comportamiento *in vitro* en soluciones acelulares de los materiales desarrollados.

- Los experimentos de solubilidad en Tris-HCl han mostrado que los materiales obtenidos reaccionan con esta solución mediante un proceso de disolución-precipitación que da lugar a la formación de apatita. Los materiales basados en  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  presentan una reactividad muy inferior a la de los materiales basados en  $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

- Los experimentos *in vitro* con SFA muestran que la formación de apatita en la interfaz SFA-material es muy lenta en todos los casos. En los materiales con silicio se detecta la liberación de iones Si al medio así como un aumento significativo de la concentración de iones Ca y P.

5. Los resultados obtenidos de la viabilidad, proliferación y crecimiento de osteoblastos fetales humanos sobre los materiales estudiados han demostrado que no son citotóxicos, se ha observado una buena adhesión y proliferación celular por lo que todos ellos pueden ser considerados biocompatibles.



**CONCLUSION GENERAL:**

Los materiales desarrollados tienen propiedades mecánicas ( $MOR \approx 40 \text{ MPa}$  y  $E \approx 60 \text{ GPa}$ ) y comportamiento in vitro cercano o mejor a los fosfatos comerciales que se utilizan actualmente en aplicaciones biomédicas.

El proceso de obtención usado en la presente tesis: molienda de atrición de alta energía de las materias primas seguido de sinterización reactiva a  $T \geq 1250^\circ\text{C}$  produce materiales con porosidades variables de  $\beta$ , o  $\alpha+\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  o  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaMg}(\text{SiO}_3)_2$ .

Este método es económicamente viable, fácilmente trasladable a una planta de cerámica técnica y susceptible de producir implantes con composiciones químicas, mineralógicas y porosidades reproducibles.



## **APENDICES**

## APENDICE 1

### **Estructura cristalina del $\beta$ -Ca<sub>3</sub>O<sub>8</sub>P<sub>2</sub>** (Tricalcium bis(phosphate(V))–beta)

Yashima, M.; Sakai, A.; Kamiyama, T.; Hoshikawa, A. "Crystal structure analysis of beta-tricalcium phosphate Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> by neutron powder diffraction". Journal of Solid State Chemistry (2003) 175, 272-277. También en Golden Book of Phase Transitions, Wroclaw (2002) 1, 1-123

Datos estructurales de la celdilla unidad romboédrica (grupo espacial R3C) (161): a=10,4352(2) Å, b=10,4352(2) Å, c=37,4029(5) Å,  $\alpha=90^\circ$ ,  $\beta=90^\circ$ ,  $\gamma=120^\circ$ ; Z=21, V=3527,26 Å<sup>3</sup>, D<sub>th</sub>=3,066 g·cm<sup>-3</sup>.

Whitlockite: PDC =01-072-7587: PDF =70-2065

Estable entre 193 y 1408 K.

Átomo	Sitio Wyckoff	oxidación	X	y	Z	B <sub>iso</sub>	Nivel de Ocupación
Ca1	(18b)	2	0,7259(6)	0,8618(7)	0,1663(2)	0,38(9)	1
Ca2	(18b)	2	0,6188(6)	0,8255(6)	-0,0332(2)	0,27(9)	1
Ca3	(18b)	2	0,7266(4)	0,8514(5)	0,0611(2)	0,76(7)	1
Ca4	(6a)	2	0	0	-0,0851(6)	2,0(8)	0,43(4)
Ca5	(6a)	2	0	0	0,7336(3)	0,76(7)	1
P1	(6a)	5	0	0	0	0,41(13)	1
P2	(18b)	5	0,6872(4)	0,8606(5)	0,8685(2)	0,29(8)	1
P3	(18b)	5	0,6530(5)	0,8464(5)	0,7668(2)	0,14(8)	1
O1	(18b)	-2	0,7256(6)	-0,0944(5)	-0,0917(2)	1,79(10)	1
O2	(18b)	-2	0,7674(6)	0,7833(6)	0,8548(2)	1,66(12)	1
O3	(18b)	-2	0,7298(5)	0,0088(5)	0,8486(2)	0,77(9)	1
O4	(18b)	-2	0,5221(5)	0,7608(6)	0,8627(2)	1,25(9)	1
O5	(18b)	-2	0,5987(5)	-0,0488(5)	0,7794(2)	0,44(8)	1
O6	(18b)	-2	0,5738(6)	0,6930(6)	0,7850(2)	1,32(10)	1
O7	(18b)	-2	0,0803(5)	0,8990(5)	0,7771(2)	0,27(7)	1
O8	(18b)	-2	0,6320(4)	0,8258(5)	0,7268(2)	0,84(8)	1
O9	(18b)	-2	0,0057(7)	0,8624(5)	-0,0115(2)	1,36(8)	1
O10	(6a)	-2	0	0	0,0421(2)	1,06(14)	1

## APENDICE 2

### **Estructura cristalina del $\alpha$ -Ca<sub>3</sub>O<sub>8</sub>P<sub>2</sub>** (Tricalcium bis(phosphate(V) alpha).

Mathew, M.;Schroeder, L.W.;Dickens, B.;Brown, W.E. "The crystal structure of alpha-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. Golden Book of Phase Transitions, Wroclaw (2002) 1, 1-123 y Acta Crystallographica B (1977) 33, 1325-1333

Datos estructurales de la celdilla unidad monoclinica (grupo espacial P121/a1)  
a= 12,887(2) Å, b=27,280(4) Å, c=15,219(2) Å,  $\alpha$ =90,0°;  $\beta$ =126,20(1)°;  $\gamma$ =90,0°  
Z= 24, V=4317,53 Å<sup>3</sup>, D<sub>th</sub>=2,866 g·cm<sup>-3</sup>.

PDC =01-070-0364: PDF =29-359

Estable entre 1408 y 1725 K.

Átomo	Sitio	oxidación	x	y	z	B <sub>iso</sub>	Ocupación
Ca1	(4e)	2	0,39138(13)	0,02600(4)	0,08612(10)	0	1
Ca2	(4e)	2	0,14742(12)	0,04937(4)	0,32729(9)	0	1
Ca3	(4e)	2	0,08768(12)	0,07286(4)	0,04976(9)	0	1
Ca4	(4e)	2	0,14267(12)	0,08946(4)	0,55957(9)	0	1
Ca5	(4e)	2	0,05783(13)	0,08708(4)	0,74743(10)	0	1
Ca6	(4e)	2	0,36805(13)	0,13863(4)	0,33207(10)	0	1
Ca7	(4e)	2	0,12125(12)	0,19139(4)	0,94434(10)	0	1
Ca8	(4e)	2	0,37108(12)	0,21591(4)	0,67698(9)	0	1
Ca9	(4e)	2	0,38603(12)	0,23433(4)	0,93751(9)	0	1
Ca10	(4e)	2	0,36956(12)	0,25894(4)	0,43849(10)	0	1
Ca11	(4e)	2	0,41359(14)	0,24537(4)	0,20819(10)	0	1
Ca12	(4e)	2	0,14746(12)	0,30227(4)	0,67533(10)	0	1
Ca13	(4e)	2	0,39021(12)	0,35179(5)	0,07293(10)	0	1
Ca14	(4e)	2	0,17089(13)	0,37277(4)	0,32417(10)	0	1
Ca15	(4e)	2	0,10282(12)	0,41293(4)	0,04926(9)	0	1
Ca16	(4e)	2	0,13909(12)	0,42447(4)	0,56149(9)	0	1
Ca17	(4e)	2	0,11815(12)	0,41466(4)	0,80001(10)	0	1
Ca18	(4e)	2	0,35132(12)	0,47366(4)	0,30781(10)	0	1
P1	(4e)	5	0,38800(15)	0,13702(5)	0,11108(11)	0	1
P2	(4e)	5	0,37924(16)	0,13123(5)	0,54396(12)	0	1
P3	(4e)	5	0,10908(16)	0,19220(5)	0,70029(12)	0	1
P4	(4e)	5	0,13563(16)	0,20844(5)	0,15665(12)	0	1
P5	(4e)	5	0,12481(15)	0,30784(5)	0,89906(11)	0	1
P6	(4e)	5	0,12715(16)	0,29631(5)	0,45789(12)	0	1
P7	(4e)	5	0,39490(16)	0,36306(5)	0,29933(12)	0	1
P8	(4e)	5	0,37340(15)	0,36794(5)	0,84241(12)	0	1
P9	(4e)	5	0,38889(16)	0,47498(5)	0,10213(12)	0	1
P10	(4e)	5	0,36219(16)	0,46463(5)	0,52427(12)	0	1
P11	(4e)	5	0,13742(16)	0,52919(5)	0,69994(12)	0	1
P12	(4e)	5	0,12623(16)	0,53965(5)	0,15574(12)	0	1

Átomo	Sitio	Oxidación	x	y	z	B <sub>iso</sub>	Ocupación
O1	(4e)	-2	0,2761(4)	0,1011(1)	0,0641(3)	0	1
O2	(4e)	-2	0,3488(4)	0,1793(1)	0,0326(3)	0	1
O3	(4e)	-2	0,5086(4)	0,1095(1)	0,1384(3)	0	1
O4	(4e)	-2	0,4290(4)	0,1592(1)	0,2211(3)	0	1
O5	(4e)	-2	0,3132(4)	0,1366(1)	0,6013(3)	0	1
O6	(4e)	-2	0,2897(4)	0,1103(1)	0,4287(3)	0	1
O7	(4e)	-2	0,4194(4)	0,1833(1)	0,5351(3)	0	1
O8	(4e)	-2	0,5032(4)	0,1002(1)	0,6140(3)	0	1
O9	(4e)	-2	0,0035(4)	0,2320(1)	0,6347(3)	0	1
O10	(4e)	-2	0,0845(4)	0,1475(1)	0,6307(3)	0	1
O11	(4e)	-2	0,2388(4)	0,2181(1)	0,7446(3)	0	1
O12	(4e)	-2	0,1104(4)	0,1741(1)	0,7957(3)	0	1
O13	(4e)	-2	0,0070(4)	0,2316(1)	0,1227(3)	0	1
O14	(4e)	-2	0,1014(4)	0,1557(1)	0,1099(3)	0	1
O15	(4e)	-2	0,1856(4)	0,2361(1)	0,1007(3)	0	1
O16	(4e)	-2	0,2366(4)	0,2081(1)	0,2791(3)	0	1
O17	(4e)	-2	0,2461(4)	0,2766(1)	0,9563(3)	0	1
O18	(4e)	-2	0,1543(4)	0,3530(1)	0,9698(3)	0	1
O19	(4e)	-2	0,0116(4)	0,2771(1)	0,8759(3)	0	1
O20	(4e)	-2	0,0852(4)	0,3257(1)	0,7864(3)	0	1
O21	(4e)	-2	0,2139(4)	0,2728(1)	0,5702(3)	0	1
O22	(4e)	-2	0,1847(4)	0,2938(1)	0,3931(3)	0	1
O23	(4e)	-2	0,1033(4)	0,3501(1)	0,4688(3)	0	1
O24	(4e)	-2	-0,0051(4)	0,2706(1)	0,3896(3)	0	1
O25	(4e)	-2	0,5038(4)	0,4012(1)	0,3672(3)	0	1
O26	(4e)	-2	0,3707(4)	0,3332(1)	0,3704(3)	0	1
O27	(4e)	-2	0,2720(4)	0,3944(1)	0,2247(3)	0	1
O28	(4e)	-2	0,4199(4)	0,3301(1)	0,2315(3)	0	1
O29	(4e)	-2	0,5017(4)	0,3874(1)	0,8709(3)	0	1
O30	(4e)	-2	0,3861(4)	0,3117(1)	0,8594(3)	0	1
O31	(4e)	-2	0,3476(4)	0,3919(1)	0,9191(3)	0	1
O32	(4e)	-2	0,2571(4)	0,3781(1)	0,7261(3)	0	1
O33	(4e)	-2	0,2479(4)	0,4592(1)	0,0362(3)	0	1
O34	(4e)	-2	0,4076(5)	0,5066(2)	0,0330(4)	0	1
O35	(4e)	-2	0,4774(4)	0,4299(1)	0,1399(3)	0	1
O36	(4e)	-2	0,4314(4)	0,5011(1)	0,2099(3)	0	1
O37	(4e)	-2	0,3400(4)	0,4363(1)	0,5990(3)	0	1
O38	(4e)	-2	0,2842(4)	0,4424(1)	0,4084(3)	0	1
O39	(4e)	-2	0,3292(4)	0,5193(1)	0,5186(3)	0	1
O40	(4e)	-2	0,5078(4)	0,4605(1)	0,5782(3)	0	1
O41	(4e)	-2	0,0163(4)	0,5607(1)	0,6247(3)	0	1
O42	(4e)	-2	0,1716(4)	0,4979(1)	0,6369(3)	0	1
O43	(4e)	-2	0,2515(4)	0,5665(1)	0,7643(3)	0	1
O44	(4e)	-2	0,1269(4)	0,4986(1)	0,7785(3)	0	1
O45	(4e)	-2	0,0045(4)	0,5568(1)	0,1439(3)	0	1
O46	(4e)	-2	0,1229(4)	0,4831(1)	0,1540(3)	0	1
O47	(4e)	-2	0,1189(4)	0,5592(1)	0,0578(3)	0	1
O48	(4e)	-2	0,2542(4)	0,5551(1)	0,2620(3)	0	1

### APENDICE 3

#### **Estructura cristalina de la $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ (Apatita).**

G. Renaudin, P. Laquerrie`reb Y. Filinchuk, E. Jallotd and J. M. Nedelec. "Structural characterization of sol–gel derived Sr-substituted calcium phosphates with anti-osteoporotic and anti-inflammatory properties". Journal of Materials Chemistry 2008, 18, 3593-3600.

Datos estructurales de la celdilla unidad hexagonal (grupo espacial  $P6_3/m;(176)$ )  $Z = 2$

$a=9,4239(1) \text{ \AA}$ ,  $b=9,4239(1) \text{ \AA}$ ,  $c=6,8841(1) \text{ \AA}$ ,  $\alpha=90,0^\circ$ ,  $\beta=126,20(1)^\circ$ ,  $\gamma=90,0^\circ$

$V=525,75 \text{ \AA}^3$ ,  $D_{th}=3,16 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ .

$R_{\text{Bragg}} = 0,026; 0,013$

$R_p = 0,021; 0,018$

$R_{wp} = 0,029; 0,027$

Átomo	Sitio	oxidación	<i>x</i>	<i>y</i>	<i>z</i>	Biso/ $\text{\AA}^2$	Nivel de Ocupación
Ca1	(4f)	2	1/3	2/3	0.0013(2)	0.29(2)	1
Ca2	(6h)	2	0,2462(1)	0,9926(1)	$\frac{1}{4}$	0,29(2)	1/2
P1	(6h)	5	0,3988(2)	0,3691(2)	$\frac{1}{4}$	0,38(3)	1/2
O1	(6h)	-2	0,3260(3)	0,4830(3)	$\frac{1}{4}$	0,12(3)	1/2
O2	(6h)	-2	0,5875(3)	0,4653(3)	$\frac{1}{4}$	0,12(3)	1/2
O3	(12i)	-2	0,3407(2)	0,2559(2)	0,0704(2)	0,12(3)	1
O4	(4e)	-2	0	0	0,2030(9)	0,12(3)	1/2
H1	(4e)	1	0	0	0,073(3)	1,2 x 0,12(3)	1/2